

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah
(*Citrullus vulgaris*) Sebagai Terapi Tikus (*Rattus
novergicus*) Model Diabetes Melitus Tipe I yang
Diinduksi Streptozotocin Berdasarkan
Histopatologi Ginjal Dan Ekspresi
IL-1 β**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

YEHEZKIEL GIANKA TAMPUBOLON

135130107111013



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ALBEDO SEMANGKA MERAH (*Citrullus vulgaris*) SEBAGAI TERAPI TIKUS (*Rattus novergicus*) MODEL DIABETES MELITUS TIPE I YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN BERDASARKAN HISTOPATOLOGI GINJAL DAN EKSPRESI IL-1 β

Oleh:

YEHEZKIEL GIANKA TAMPUBOLON
135130107111013

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal, 22 Februari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sri Murwani, drh., MP
NIP. 19630101 198903 2 001

drh. Dian Vidiastuti, M.Si
NIP. 19820207 200912 2 003

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yehezkiel Gianka Tampubolon

NIM : 135130107111013

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*) Sebagai Terapi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus Tipe I Yang Diinduksi *Streptozotocin* Berdasarkan Histopatologi Ginjal dan Ekspresi IL-1 β

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 22 Februari 2018

Yang menyatakan,

(Yehezkiel Gianka Tampubolon)
NIM. 135130701111013

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*)
Sebagai Terapi tikus (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus Tipe 1
yang Diinduksi Streptozotocin Berdasarkan Histopatologi
Ginjal dan Ekspresi IL-1 β**

ABSTRAK

Diabetes Melitus (DM) tipe 1 adalah penyakit metabolisme yang mempunyai karakteristik terjadi hiperglikemia (kadar gula darah meningkat) akibat kerusakan sel beta pankreas yang menyebabkan penurunan produksi insulin. Albedo semangka (kulit buah yang berwarna putih mengandung zat sitrulin sebesar 60% Zat sitrulin akan bereaksi dengan enzim tubuh ketika dikonsumsi, lalu diubah menjadi arginin yang merupakan asam amino non-esensial yang memiliki peran sebagai antioksidan untuk melawan radikal bebas pada tubuh. Tujuan penelitian ini untuk menguji ekstrak albedo semangka merah sebagai terapi Diabetes Melitus tipe 1 yang diinduksi Streptozotocin. Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 8-12 minggu, berat badan 100-150 gram terdiri dari lima kelompok, yaitu: kontrol negatif, kontrol positif, P1 ekstrak albedo semangka merah 500 mg/kg BB, P2 1000 mg/kg BB dan P3 1500 mg/kg BB. Pemeriksaan parameter yaitu histopatologi ginjal dengan pewarnaan HE dan Ekspresi IL-1 β metode Imunohistokimia dan dianalisis secara statistik dengan *one-way* ANOVA, ($\alpha=0,05$) dan uji Tukey. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak albedo semangka merah menurunkan ekspresi IL-1 β dan kerusakan ginjal dengan dosis terbaik yaitu 1500 mg/Kg BB. Kesimpulan penelitian ini, ekstrak albedo semangka merah dapat digunakan terapi bagi penderita Diabetes Melitus tipe I

Kata kunci : Diabetes Melitus I, Ekstrak Albedo Semangka Merah, IL-1 β , Histopatologi Ginjal

Therapy Effect of Red Watermelon (*Citrullus vulgaris*) Albedo Extract on the White Rat (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus Type I Models Induced by Streptozotocin Based on Histopathology Kidney and Expression IL-1 β

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 1 (DM) is a metabolic disease that had characterized happens hyperglycemia (increased blood sugar levels) due to pancreatic beta cell damage that will cause the onset of insulin deficiency. Watermelon albedo (white-rind) contain a sitrulin of 60% sitrulin Substances will react with the body's enzymes when consumed, and then converted into arginine which is a non-essential amino acid that has a role as an antioxidant to fight free radicals in the body. The purpose of this research was to test the Red watermelon albedo extracts as a therapy for Diabetes mellitus type 1 Streptozotocin induced. This experiment is going to designed use completely randomized design. Research using rats (*Rattus norvegicus*) males aged 8-12 week, weight 100-150 grams divided five groups, namely: the negative control, positive control, P1 red watermelon albedo extract 500 mg/kg, P2 1000 mg/kg and P3 1500 mg/kg. Examination of the parameters, namely kidney histopathology with HE staining and expression of IL-1 β Immunohistochemical method and analyzed statistically with ANOVA, one-way ($\alpha = 0.05$) and Tukey test. The results showed the awarding of the Red watermelon albedo extracts decreases the expression of IL-1 β and kidney damage with a dose of 1500 mg/Kg BB. Conclusions this study, red watermelon albedo extracts can be used in therapy for patients with Diabetes mellitus type I.

Keywords: DM Type I, Streptozotocin, Red Watermelon, Albedo, IL-1 β , Histopathology Kidney.

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur penulis ucapkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerahNya sehingga penyusunan Skripsi yang berjudul “*Pengaruh Pemberian Ekstrak Albedo Semangka (Citrullus vulgaris) sebagai Terapi Tikus Putih (Rattus norvegicus) Model Diabetes Melitus Tipe I Yang Diinduksi Streptozotocin Berdasarkan Histopatologi Ginjal dan Ekspresi IL-1 β* ” dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penulisan Skripsi ini banyak mengalami kendala, namun berkat bantuan, bimbingan, kerjasama dari berbagai pihak dan berkat dari Tuhan yang Maha Esa, sehingga kendala-kendala yang dihadapi tersebut dapat diatasi. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dr. Sri Murwani, drh., MP., selaku pembimbing I dan drh. Dian Vidiastuti, M.Si., selaku pembimbing II yang telah dengan sabar dan ikhlas meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan, motivasi, arahan, dan saran-saran yang sangat berharga kepada penulis selama menyusun Skripsi.
2. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech., dan drh. Indah Amalia, M.Si., yang telah bersedia meluangkan waktu sebagai penguji skripsi.
3. Prof. Dr. Aulianni'am, drh.,DES., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Keluarga tercinta, Bapak drh. Anggiat Halomoan Tampubolon, Ibu Artika Merry Eva Pasaribu, dan adik Debby Rebecca, Gilbert Alexander serta Olivia Maharani yang senantiasa memberikan dorongan, semangat, dan doa yang tiada henti demi keberhasilan penulis.
5. Pungky, Ananta dan Fitri teman satu kelompok skripsi yang selalu bahu-membahu dan berbagi suka maupun duka. Terima kasih juga kepada seluruh keluarga besar B-TIS yang selalu kompak dan senantiasa memberikan keceriaan selama beberapa tahun terakhir ini.
6. Sahabat-sahabat tercinta untuk waktu dan inspirasi yang diberikan. Sandro Imanuel Sijabat, Otniel Yusuf Pasaribu, Arief Kahulta Sinuraya, Berlin

Bastian Alfonso Saragih, Try Harapan Jaya Simamora, Risky Ivnatius Tambunan, Bima Dwi Satriya, Delfi Rizki Akana dan Desi Zulvina.

7. Keluarga besar korlap FKH UB yang selalu menghibur dalam kondisi apapun. Korlap Brava (LAVA) yang selalu menemani dan memberi inspirasi.
8. Partner, Sahabat yang meluangkan waktu menemani disaat susah maupun senang penulis dalam mengerjakan skripsi yaitu Alida Vidya Puspita.
9. Teman yang mendengarkan keluh kesah mengenai kehidupan kampus maupun pribadi penulis yaitu Elsa, Ikhwani, Ananta dan Wildan.
10. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam penyusunan Skripsi ini tidak lepas dari kekurangan karena keterbatasan waktu, tenaga, materi dan pengetahuan penulis. Oleh karena itu, dibutuhkan saran dan masukan untuk menyempurnakan Skripsi ini.

Malang, 22 Februari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH	xiii
 BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
 BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Diabetes Melitus (DM)	7
2.1.1 Klasifikasi Diabetes Melitus	8
2.1.2 Patogenesis Diabetes Melitus	9
2.1.3 Gejala Klinis dan Komplikasi Diabetes Melitus	9
2.1.4 Diagnosis dan Terapi Diabetes Melitus	11
2.2 <i>Streptozotocin</i>	14
2.2.1 Patofisiologi dan Akibat Induksi STZ	14
2.3 Albedo Semangka Merah (<i>Citrullus vulgaris</i>)	16
2.4 Ginjal	19
2.4.1 Definisi Ginjal	19
2.4.2 Anatomi dan Fungsi Ginjal	21
2.4.3 Pengaruh DM pada Ginjal	23
2.5 Interleukin 1 β	25
2.6 Tikus Putih	27
 BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	30
3.1 Kerangka Konseptual	30
3.2 Hipotesis Penelitian	34
 BAB 4. METODELOGI PENELITIAN	35
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	35

4.2	Alat dan Bahan.....	35
4.2.1	Alat.....	35
4.2.2	Bahan	36
4.3	Tahap Penelitian	36
4.4	Prosedur Kerja	37
4.4.1	Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba	37
4.4.2	Pembuatan Hewan Model Diabetes Melitus Tipe (DM) I	39
4.4.3	Pembuatan dan Perhitungan Dosis Ekstrak Albedo Semangka Merah (<i>Citrullus vulgaris</i>).....	39
4.4.4	Pemeriksaan Kadar Gula Darah	40
4.4.5	Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (<i>Citrullus vulgaris</i>).....	41
4.4.6	Isolasi Organ Ginjal.....	41
4.4.7	Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal dengan Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE).....	42
4.4.8	Pembuatan dan Perhitungan Preparat Histopatologi Ginjal dengan pewarnaan Imunohistokimia.....	45
4.5	Analisa Data.....	46
BAB 5.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
5.1	DM tipe I Hasil Induksi Streptozotocin (STZ).....	47
5.2	Pengaruh Pemberian Terapi Ekstrak Albedo Semangka Merah (<i>Citrullus vulgaris</i>) Terhadap Histopatologi Ginjal.....	47
5.3	Pengaruh Pemberian Terapi Ekstrak Albedo Semangka Merah (<i>Citrullus vulgaris</i>) Terhadap Ekspresi IL-1 β Ginjal	60
BAB 6.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	68
6.1	Kesimpulan	68
6.2	Saran.	68
	DAFTAR PUSTAKA.....	69
	LAMPIRAN.....	78

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Albedo Semangka Merah.....	17
2.2 Histologi Normal Glomerulus Ginjal	20
2.3 Anatomi Ginjal.....	22
2.4 Histopatologi Ginjal Tikus dengan Pewarnaan HE.	24
2.5 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	28
3.1 Mekanisme Kerja <i>Streptozotocin</i> dan Sitrulin	30
5.1 Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus dengan Pewarnaan HE.....	48
5.2 Ekspresi Interleukin-1 β	63



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kandungan Gizi Buah Semangka	18
2.2 Data Biologi Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	28
4.1 Pembagian Kelompok Hewan Coba.	38
5.1 Tabel rata-rata Ekspresi Interleukin-1 β	61



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Penelitian	56
2. Sertifikat Laik Etik	57
3. Dosis <i>Streptozotocin</i>	58
4. Pembuatan Ekstrak Albedo Semangka Merah (<i>Citrullus vulgaris</i>).....	60
5. Surat Keterangan Determinasi Tanaman Semangka Merah	61
6. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Albedo Semangka Merah (<i>Citrullus vulgaris</i>)	62
7. Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal	65
6. Metode Imunohistokimia	66



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
AGEs	<i>Advanced Glycation End Products</i>
ANOVA	Analisis of Variant
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BB	Berat badan
BNJ	Benar Nyata Jujur
dl	desi liter
DM	Diabetes Melitus
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
gr	gram
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
HE	Hematoksilin Eosin
IL-1 β	<i>Interleukin 1β</i>
mg	mili gram
ml	mili liter
Na ₂ CO ₃	<i>Natrium Carbonat</i>
NaCl	<i>Natrium Chloride</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
°C	Derajat <i>celcius</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Derajat keasaman
RAL	Rancangan Acak Lengkap
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	<i>Streptavidin-Horseradish Peroxidase</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit gangguan sistem endokrin yang ditandai dengan keadaan hiperglikemia atau peningkatan kadar glukosa dalam darah. Kadar glukosa yang tinggi pada keadaan DM disebabkan oleh gangguan metabolisme glukosa akibat penurunan produksi insulin. Produksi insulin yang menurun pada kejadian DM dipicu oleh kerusakan sel-sel β pankreas yang merupakan produsen insulin didalam tubuh. Sekresi insulin yang berkurang menyebabkan penyakit DM tipe I atau *Insulin-Dependen Diabetes Mellitus* (IDDM) (Animesh, 2006). Hiperglikemia kronis pada diabetes melitus dapat disertai komplikasi gangguan fungsi beberapa organ tubuh salah satunya ginjal (World Health Organization, 2006).

Diabetes melitus (DM) tidak hanya terjadi pada manusia, penyakit ini cukup banyak menyerang hewan peliharaan seperti anjing dan kucing. Kejadian diabetes melitus pada kucing yaitu 1 dari 200 kucing di United Kingdom dan angka tersebut terus meningkat yang dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti obesitas, *breed*, umur hewan yang tua dan kurangnya *exercise* pada hewan (Gunn-Moore, 2013). Prevalensi penyakit diabetes melitus pada anjing tahun 2005 di United Kingdom yaitu 0,32% (Catchpole *et al.*, 2005; Gunn-Moore, 2013). Diabetes melitus umumnya menyerang anjing pada umur antara 5 hingga 12 tahun, jenis anjing seperti *Samoyed*, *Tibetan*

Terrier dan *Caim Terrier* merupakan anjing yang umumnya menderita diabetes melitus (Catchpole *et al.*, 2005).

Salah satu faktor penyebab hewan model DM tipe 1 adalah agen diabetogenik yaitu *Streptozotocin* (STZ) yang dapat menyebabkan insulin yang diproduksi menjadi rendah atau bahkan tidak dapat menghasilkan insulin kembali. *Streptozotocin* (STZ) bekerja dengan cara membangkitkan oksigen reaktif yang apabila diinduksi ke dalam tubuh tikus model dapat menyebabkan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Spesies oksigen reaktif (ROS) berperan terhadap patogenesis berbagai inflamasi dan disfungsi sel β pankreas. Hiperglikemia menyebabkan peningkatan ROS dalam mitokondria yang berakibat kerusakan *deoxyribonucleic acid* (DNA) pada sel (Nugroho, 2006).

Diabetes melitus tipe 1 disebabkan kerusakan sel β pankreas dan menimbulkan komplikasi yang berakibat fatal bagi penderitanya, salah satunya organ ginjal. Komplikasi disebabkan oleh tingginya konsentrasi glukosa darah (hiperglikemia) karena glukosa tidak bisa masuk ke dalam sel untuk dimetabolisme menjadi energi. Keadaan hiperglikemia meningkatkan modifikasi molekuler sehingga terjadi peningkatan radikal bebas, kondisi ini disebut stres oksidatif yang memiliki kontribusi dalam komplikasi DM tipe 1 (Setiawan dkk., 2005). Kondisi hiperglikemia meningkatkan *Advanced Glycation End Products* (AGEs) yang merupakan sumber ROS yang mengakibatkan kerusakan glomerulus ginjal dan peningkatan permeabilitas kapiler glomerulus akibatnya protein lolos selama proses filtrasi yang ditandai

dengan proteinuria dan albuminuria (Schier, 2007). Diabetes melitus tipe I menyebabkan timbulnya peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi akibat terjadinya kerusakan pada ginjal, terutama interleukin-1 β (IL-1 β) sebagai mediator utama dari respon inflamasi (Reis *et al.*, 2012).

Tujuan utama dilakukannya terapi DM adalah untuk menstabilkan kadar gula darah, terapi untuk mengontrol kadar gula darah pada diabetes melitus kurang mendapatkan hasil maksimal, metode paling efektif yaitu menggunakan insulin dari luar tubuh namun sulit diaplikasikan (Hadisaputro, 2012). Menurut Dalimartha (2007) pengobatan modern untuk penderita diabetes melitus memiliki efek samping dan relatif mahal, sehingga penyembuhan alternatif yang lebih aman dan murah yaitu pengobatan menggunakan bahan alam perlu selalu dikembangkan. Bahan alam yang dikonsumsi sebagai obat memiliki lebih banyak manfaat dan efek samping lebih kecil bagi kesehatan daripada obat sintetis (Pramono, 2002).

Penelitian yang dilakukan oleh Sugiyanta (2011), kulit semangka merah atau yang sering disebut dengan albedo, mengandung sitrulin mencapai 60% atau 24,4 mg/g berat kering. Kandungan sitrulin dalam albedo digunakan untuk terapi DM tipe I. Sitrulin adalah asam amino non-esensial yang berperan penting dalam metabolisme dan regulasi *Nitrogen Oxide* (NO). Sitrulin memicu pembentukan arginin melalui siklus *citrullus*-NO, dimana arginin meningkatkan jumlah NO endothelial, yang secara langsung berperan dalam regulasi insulin. Sekresi insulin merangsang peningkatan glikogenesis di hepar, sehingga kadar glukosa darah menjadi turun (Sugiyanta, 2011).

Sitrulin memiliki efek penghambatan terhadap sitokin proinflamasi seperti IL-1 β . Selain itu, sitrulin sebagai antioksidan juga mempunyai efek menghambat radikal bebas, *superoxid*, dan hidroperoksida. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) sebagai terapi diabetes melitus tipe I berdasarkan ekspresi IL-1 β dan gambaran histopatologi ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) model DM tipe 1.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Apakah pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dapat menurunkan ekspresi IL-1 β pada ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) model DM tipe I yang induksi *streptozotocin*?
2. Apakah pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dapat menghambat kerusakan ginjal pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model DM tipe I yang induksi *streptozotocin*?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan bobot badan antara 100-150 gram

(Sugiyanta, 2011) yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Brawijaya Malang, Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapat sertifikat Laik Etik (Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya) dengan nomor 781-KEP-UB.

2. *Streptozotocin* (STZ) yang digunakan adalah STZ yang didapatkan dari *Nacalai Tesque, INC.* (no katalog 32238-91) dan diinduksikan secara *intra peritoneal* dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut. Tikus dinyatakan diabetes apabila memiliki kadar glukosa darah lebih dari 300 mg/dl (Aulani'am dkk., 2005).
3. Albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) diperoleh dari hasil pertanian semangka rakyat di desa Beji, Batu yang merupakan pusat agrobisnis pertanian di daerah Malang dan Batu. Albedo semangka yang digunakan yaitu semangka yang sudah siap panen berumur 70-100 setelah penanaman.
4. Ekstraksi albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. merupakan hasil modifikasi dosis efektif yang pernah diteliti oleh Sugiyanta (2011) untuk terapi diabetes melitus tipe II, yaitu 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB. Pada penelitian ini, dosis yang digunakan dibedakan menjadi 3, yaitu dosis 1 (500 mg/kg BB), dosis 2 (1000 mg/kg BB), dan dosis 3 (1500 mg/kg BB) selama 14 hari secara *per-oral*.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini berupa gambaran histopatologi ginjal DM dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE).

6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi IL-1 β pada organ ginjal DM dengan pewarnaan imunohistokimia.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui ekspresi imunohistokimia IL-1 β pada ginjal tikus (*Rattus novergicus*) model DM tipe 1 hasil induksi *Streptozotocin* setelah pemberian terapi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*).
2. Mengetahui gambaran histopatologi pada ginjal tikus (*Rattus novergicus*) model DM tipe 1 hasil induksi *Streptozotocin* setelah diberi terapi albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk menambah ilmu pengetahuan sebagai kajian ilmiah dan membuktikan pengaruh pemberian ekstrak albedo semangka merah berpengaruh terhadap ekspresi imunohistokimia IL-1 β dan gambaran histopatologi ginjal pada tikus model DM tipe 1 yang diinduksi *streptozotocin*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus

Diabetes Melitus (DM) adalah penyakit metabolisme yang mempunyai karakteristik terjadi hiperglikemia (kadar gula darah meningkat) akibat tubuh tidak mampu melepaskan atau menggunakan insulin dengan cukup (Hau and Hoosier, 2006). Diabetes Melitus (DM) umumnya disebabkan oleh tiga penyebab, pertama yaitu jumlah sekresi hormon insulin berkurang sehingga tidak sanggup untuk mengambil glukosa dari darah dan tidak bisa mengontrol kadar glukosa sehingga menyebabkan kadar glukosa tetap tinggi dan terbuang melalui urin (Santoso, 2001). Kedua adalah terjadi resistensi insulin yang menyebabkan jumlah insulin cukup tetapi sudah tidak sensitif lagi dan tidak mampu bekerja secara optimal, sehingga glukosa tidak dapat masuk kedalam sel yang mengakibatkan penggunaan glukosa sebagai energi terhambat dan sel menjadi kekurangan energi. Penyebab ketiga yaitu kombinasi dari penyebab pertama dan kedua (Mclung *et al.*, 2004).

Diabetes Melitus merupakan penyakit yang diturunkan atau diwariskan bukan ditularkan. Para ahli kesehatan mengatakan bahwa DM merupakan penyakit yang terpaut kromosom seks atau kelamin. Faktor herediter sering menyebabkan DM melalui peningkatan sel β pankreas terhadap penghancuran oleh antigen atau mempermudah perkembangan antibodi autoimun melawan sel-sel β pankreas, sehingga mengarah pada penghancuran sel-sel β pankreas (Price, 2006). Sel β pankreas yang hancur

menyebabkan penurunan metabolisme insulin, sehingga menimbulkan gangguan hormonal yang dapat berpengaruh terhadap kondisi hiperglikemia dan berujung pada penyakit DM (Pick, 2003).

2.1.1 Klasifikasi Diabetes Melitus (DM)

Menurut Mealy and Thomas (2006). Secara umum diabetes melitus diklasifikasikan menjadi dua tipe DM :

1. Diabetes Melitus tipe I (*Insulin Dependent Diabetes Mellitus*)

Diabetes melitus tipe I terjadi akibat dari defisiensi hormon insulin. Defisiensi insulin disebabkan oleh kerusakan sel β pankreas karena adanya reaksi autoimun sehingga dapat terjadi ketoasidosis. Keadaan ini ditandai dengan terjadinya glikosuria, hiperglikemia, hiperketonemia, ketonuria, dan hipoinsulinemia. Faktor yang menyebabkan terjadinya DM tipe I antara lain konstitusi genetik, imunologis, faktor lingkungan, gangguan metabolisme dan endokrinologi.

2. Diabetes Melitus Tipe II (*Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus*)

Diabetes melitus tipe II terjadi karena adanya resistensi insulin. Pada tipe II insulin masih dihasilkan, sehingga tingkat kejadian ketoasidosis lebih rendah dibandingkan dengan DM tipe I. DM tipe II tidak terdiagnosa karena hiperglikemia terjadi secara berangsur tanpa gejala. Pada DM tipe II terjadi peningkatan lemak pada tubuh atau terjadi obesitas. Jaringan adiposa berperan penting dalam perkembangan resistensi insulin. Peredaran asam lemak bebas dari adiposit mengalami peningkatan dan

berkontribusi dalam terjadinya resistensi insulin yaitu dengan menghambat penyerapan glukosa, sintesis glikogen dan glikolisis serta meningkatkan produksi glukosa hepar.

2.1.2 Patogenesis Diabetes Melitus (DM)

Pada DM tipe 1 atau yang disebut IDDM (*Insulin Dependent Diabetes Mellitus*) terjadi ketiadaan insulin yang mutlak, sehingga penderita membutuhkan pasokan insulin dari luar. Kondisi ini disebabkan karena adanya lesi pada sel beta pankreas. Pembentukan lesi ini disebabkan karena mekanisme gangguan autoimun dan infeksi virus yang terlibat dalam kerusakan sel-sel beta. Adanya antibodi atau autoimun yang menyerang sel beta biasanya dideteksi beberapa tahun sebelum timbulnya penyakit. DM tipe 1 dapat berkembang secara tiba-tiba, dengan tiga gejala pokok: (1) meningkatnya glukosa darah, (2) peningkatan penggunaan lemak untuk energi dan pembentukan kolesterol oleh hati, dan (3) penipisan protein tubuh (Guyton and Hall, 2011).

2.1.3 Gejala Klinis dan Komplikasi Diabetes Melitus (DM)

Gejala klinis DM meliputi gejala-gejala pada stadium kompensasi dan dekompensasi pankreas, serta gejala-gejala kronik lain. Gejala-gejala pada stadium kompensasi, yaitu polifagia, polidipsia, poliuria, dan penurunan berat badan. Gejala klinis hiperglikemia dan glikosuria akan menyebabkan tekanan osmotik di tubuli meningkat dan menghambat reabsorpsi air. Reabsorpsi yang

air terhambat akan menyebabkan penderita DM mengalami poliuria dan dehidrasi tingkat jaringan. Penderita DM tidak dapat mencegah glukosa dalam darah, sehingga akan menggunakan lemak tubuh untuk mengganti energi atau makanan bagi sel, sehingga akan terjadi ketonemia dan ketonuria serta terlihat kurus. Badan-badan keton di dalam darah akan menimbulkan asidosis (Dipiro *et.al.*, 2005).

Komplikasi DM dapat bersifat akut atau kronis. Komplikasi akut terjadi jika kadar glukosa darah seseorang meningkat atau menurun dengan tajam dalam waktu yang relatif singkat. Kadar glukosa darah dapat menurun jika penderita menjalani diet yang terlalu ketat. Sedangkan, peningkatan kadar gula tubuh secara mendadak juga dipicu oleh pola makan yang tidak terkontrol, sehingga menyebabkan komplikasi akut yang akan terjadi seperti hipoglikemia, ketoasidosis diabetikum, dan peningkatan ROS akibat hiperglikemi (Susilowati, 2006). Keadaan hiperglikemi pada diabetes melitus juga dapat memicu autooksidasi glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol sehingga terbentuk senyawa oksigen reaktif (ROS) (Rahma, dkk., 2014).

Komplikasi kronis pada DM mencakup kelainan pembuluh darah yang dapat menyebabkan serangan jantung, serangan otak yang secara umum diikuti dengan kelumpuhan, dan stroke. Kerusakan pembuluh-pembuluh darah periphal secara umum mempengaruhi bagian tubuh bawah dan kaki, kerusakan ginjal (nefropati), kerusakan saraf (neuropati) yang dapat menyebabkan kelumpuhan (paralisis), impoten, dan gangguan organ hepar

akibat peningkatan stres oksidatif, sehingga terjadi multifungsi sebagian atau keseluruhan (Guyton and Hall, 2006).

2.1.4 Diagnosis dan Terapi Diabetes Melitus (DM)

Diagnosis DM biasanya diikuti dengan adanya gejala poliuria, polidipsia, polifagia dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan penyebabnya serta ditegakkan dengan mengadakan pemeriksaan kadar glukosa darah. Pemeriksaan glukosa darah sebagai penentu diagnosis DM, yang dianjurkan adalah pemeriksaan glukosa dengan bahan darah plasma vena. Penggunaan bahan darah utuh (*whole blood*), vena ataupun kapiler tetap dapat dipergunakan dengan memperhatikan angka-angka kriteria diagnostik yang berbeda sesuai pembakuan WHO, sedangkan untuk pemantauan hasil pengobatan dapat dilakukan dengan pemeriksaan glukosa darah kapiler. Hasil TTGO (tes toleransi glukosa oral) menunjukkan bahwa tikus dengan kadar glukosa darah puasa ≥ 140 mg/dl atau kadar glukosa sewaktu ≥ 200 mg/dl (Anita, 2014; Etuk, 2010) dapat dinyatakan DM.

Pada penatalaksanaan terapi DM, langkah pertama yang harus dilakukan adalah penatalaksanaan tanpa obat berupa pengaturan diet. Apabila dalam langkah pertama ini tujuan penatalaksanaan belum tercapai, dapat dikombinasikan dengan langkah farmakologis berupa terapi insulin atau terapi obat hipoglikemik oral atau kombinasi keduanya (Ditjen Bina Farmasi dan Alkes, 2005).

Terapi non farmakologi berupa diet. Diet yang dianjurkan adalah makanan dengan komposisi yang seimbang dalam hal karbohidrat, protein dan lemak. Tujuan pengobatan diet pada diabetes adalah mencapai serta mempertahankan kadar glukosa darah mendekati kadar normal. Sedangkan terapi farmakologi berupa:

1. Insulin, insulin mempunyai peran yang sangat penting dan luas dalam pengendalian metabolisme, efek kerja insulin adalah membantu transport glukosa dari darah ke dalam sel.

Macam-macam sediaan insulin:

- Insulin kerja singkat, sediaan ini terdiri dari insulin tunggal biasa, mulai kerjanya baru sesudah setengah jam (injeksi subkutan), contoh: Actrapid, Velosulin, Humulin Regular.
- Insulin kerja panjang (*long-acting*), sediaan insulin ini bekerja dengan cara mempersulit daya larutnya di cairan jaringan dan menghambat resorpsinya dari tempat injeksi ke dalam darah. Metode yang digunakan adalah mencampurkan insulin dengan protein atau seng atau mengubah bentuk fisiknya, contoh: Monotard Human.
- Insulin kerja sedang (*medium-acting*) sediaan insulin ini jangka waktu efeknya dapat divariasikan dengan mencampurkan beberapa bentuk insulin dengan lama kerja berlainan, contoh: Mixtard 30 HM (Tjay dan Rahardja, 2002).

2. Obat antidiabetik oral, dapat dilakukan dengan menggunakan satu jenis obat atau kombinasi dari dua jenis obat (Ditjen Bina Farmasi dan Alkes, 2005).

- Golongan Sulfonilurea, golongan obat ini bekerja merangsang sekresi insulin dikelenjar pankreas, oleh sebab itu hanya efektif apabila sel-sel β Langerhans pankreas masih dapat memproduksi. contoh: Tolbutamid, Aseктоheksamid, Tolazamid, Glimepiride, Gliburid. Efek samping yang ditimbulkan yaitu gangguan penglihatan temporer, mual, muntah, nyeri perut, diare, ikterus.
- Golongan Biguanida, golongan ini yang tersedia adalah metformin, metformin menurunkan glukosa darah melalui pengaruhnya terhadap kerja insulin pada tingkat selular dan menurunkan produksi gula hati. Metformin juga menekan nafsu makan hingga berat badan tidak meningkat, sehingga layak diberikan pada penderita yang *overweight*. Efek samping yang ditimbulkan yaitu gangguan saluran pencernaan, ketoasidosis
- Golongan Tiazolidindion, golongan obat baru ini memiliki kegiatan farmakologis yang luas dan berupa penurunan kadar glukosa dan insulin dengan jalan meningkatkan kepekaan bagi insulin dari otot, jaringan lemak dan hati, sebagai efeknya penyerapan glukosa ke dalam jaringan lemak dan otot meningkat, contoh: Pioglitazone, Troglitazon. Efek samping yang terjadi yaitu edema ringan hingga sedang

2.2 Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) adalah suatu senyawa campuran dari glukosamin-nitrosourea (senyawa larut lemak yang memiliki fungsi sebagai agen pengalkilasi) dengan nama kimiawi 2-deoksi-3-(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glukopiranos (Szkudelski, 2001). *Streptozotocin* dari isolasi kultur bakteri *Streptomyces achromogenes* atau melalui sintesis, senyawa ini awalnya digunakan sebagai anti bakteri dan anti tumor, namun diketahui bahwa *Streptozotocin* memiliki efek diabetik yang baik (Pathak *et al.*, 2008).

Streptozotocin digunakan sebagai induksi diabetes melitus baik tipe I maupun tipe II pada hewan uji karena selektif merusak sel beta pankreas. *Streptozotocin* bekerja langsung pada sel beta pankreas dengan aksi sitotoksiknya dan dimediasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga dapat digunakan sebagai induksi diabetes melitus. Dosis yang digunakan untuk menginduksi diabetes melitus tipe I adalah 40-60 mg/kg BB secara intravena sedangkan dosis intraperitoneal adalah lebih dari 40 mg/kg BB. *Streptozotocin* juga dapat diberikan secara berulang, pemberian berulang dapat menggunakan dosis 20 mg/kg BB dengan induksi selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am dkk., 2005).

2.2.1 Patofisiologi dan Akibat Induksi STZ

Diabetes Melitus (DM) tipe I adalah hasil dari interaksi genetik, lingkungan, dan faktor imunologi yang mengarah terhadap kerusakan sel β pankreas. Masa sel β pankreas kemudian menurun dan sekresi insulin

menjadi semakin terganggu, mengakibatkan kadar glukosa dalam darah menjadi tinggi (Powers, 2005). Sel β pankreas merupakan satu-satunya sel tubuh yang menghasilkan insulin yang berfungsi untuk mengatur kadar glukosa dalam tubuh. Kadar glukosa pada darah penderita DM tipe 1 sangat tinggi, tetapi tubuh tidak dapat memanfaatkan secara optimal untuk membentuk energi. Oleh karena itu, energi diperoleh melalui peningkatan katabolisme protein dan lemak. Gejala yang sering mengiringi DM tipe I, yaitu poliuria, polidipsia, dan polifagia. Peningkatan volume urin terjadi disebabkan oleh diuresis osmotik (akibat peningkatan kadar glukosa darah atau hiperglikemik) dan benda-benda keton dalam urin. Lebih lanjut, diuresis osmotik tersebut akan mengakibatkan kondisi dehidrasi, kelaparan dan *shock*. Gejala haus dan lapar merupakan akibat dari kehilangan cairan dan ketidakmampuan tubuh menggunakan nutrisi (Lawrence, 1994).

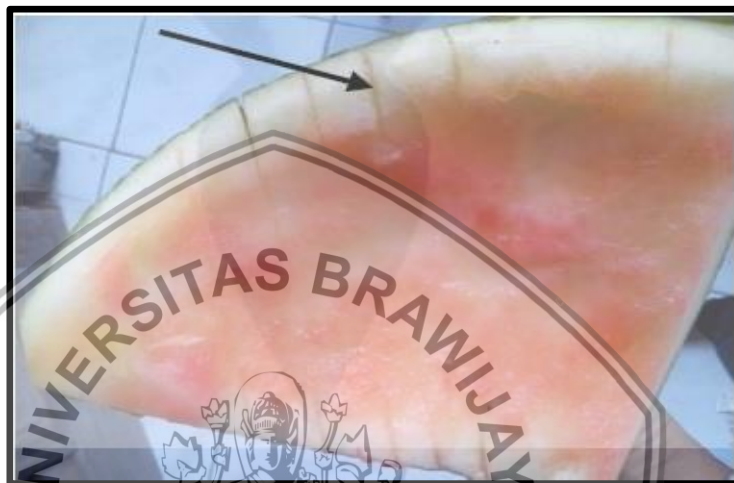
Streptozotocin merupakan bahan kimia yang sering digunakan sebagai induksi diabetes melitus karena kemampuannya dalam merusak sel β pulau langerhans yang memproduksi insulin. *Streptozotocin* juga merupakan agen yang dapat memecah rantai *Deoxyribonucleic acid* (DNA), merusak transportasi glukosa dan fungsi glukokinase yang mengakibatkan sel β pulau langerhans mengalami destruksi. Penggunaan *multiple low dose streptozotocin* lebih dapat dikontrol karena hanya beberapa bagian sel β pulau langerhans yang mengalami destruksi untuk menjadi kondisi diabetes melitus, dimana sekresi insulin masih ada untuk mencegah terjadinya ketoasidosis dan penggunaan induksi insulin (Poretsky, 2010).

Streptozotocin sebagai agen diabetogenik, yaitu dengan menembus sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi *streptozotocin* intra-seluler menghasilkan penambahan DNA sel β pankreas dengan cara alkilasi. Alkilasi DNA oleh *streptozotocin* melalui gugus nitrosourea mengakibatkan kerusakan pada sel beta pankreas. *Streptozotocin* merupakan donor *Nitrit Oksida* (NO) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP. *Streptozotocin* juga mampu membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β pankreas. Pembentukan anion superoksida karena aksi *streptozotocin* menekan kerja mitokondria dalam menghasilkan ATP sehingga terjadi defosforilasi ATP yang meningkatkan substrat xantin oksidase dimana sel sangat peka terhadap enzim ini. Peran xantin oksidase dalam pembentukan anion superoksida aktif dapat merespon pembentukan radikal bebas seperti hidrogen peroksida dan radikal hidroksil, dengan cara menghambat siklus krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitkondria. Produksi ATP mitokondria yang terbatas selanjutnya mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel β pankreas (Szkudelski, 2001).

2.3 Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*)

Tanaman buah semangka (*Citrullus vulgaris*) dibudidayakan agar dapat dikonsumsi langsung secara segar. Semangka memiliki beberapa bagian mulai dari lapisan terluar berupa kulit, lapisan tengah, dan daging buah semangka (Nur dkk., 2016). Semangka merah (*Citrullus vulgaris*) merupakan

buah yang memiliki kulit tebal dan berdaging, licin, warna kulit dapat berupa hijau tua, kuning agak putih, atau hijau muda bergaris-garis putih (Sugiyanta, 2011). Lapisan yang berwarna putih, yaitu antara kulit dan daging buah semangka yang berwarna disebut albedo dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*) (Rahman, 2010)

Menurut Sobir dan Siregar (2010), klasifikasi ilmiah semangka adalah sebagai berikut:

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Cucurbitales

Familia : Cucurbitaceae

Genus : *Citrullus*

Spesies : *Citrullus vulgaris*

Albedo semangka (kulit buah yang berwarna putih) dapat disebut sebagai lapisan tengah (mesokarp) buah semangka yang terletak di antara epidermis luar (*eksokarp*) dan epidermis dalam (*endokarp*). Albedo semangka merupakan bagian kulit buah yang paling tebal dan berwarna putih.

Sebagaimana jaringan tanaman lunak yang lain, albedo semangka juga tersusun atas pektin, salah satu peran pektin adalah menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Hasil penapisan fitokimia diketahui bahwa dalam ekstrak pulpa daging putih semangka terkandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, dan polifenol (Sugiyanta, 2011),

Tabel 2.1 Kandungan gizi buah semangka per 100 gram bahan

Komposisi	Jumlah
Energi	30 kkal
Lemak	0,15 gr
Lemak jenuh	0,016 gr
Lemak tak jenuh tunggal	0,037 gr
Kolesterol	0 mg
Protein	0,61 g
Karbohidrat	7,55 g
Serat	0,4 g
Gula	6,2 g
Sodium	1 mg
Kalium	112 mg
Lemak tak jenuh ganda	0,05 g

(Ardinata, 2015)

Kualitas gizi semangka menunjukkan bahwa sangat kaya akan vitamin A 3%, yang berbeda vitamin dari vitamin B kompleks seperti Tiamin (Vit. B1), Riboflavin (Vit. B2), Niacin (Vit. B3), pantotenat acid (B5), vitamin B6 dan folat (Vit. B9) yang berkisar antara 1-3%, Vitamin C 14%. Komposisi Mineral: Calcium 1%, Besi 2%, Magnesium 3%, Fosfor 2%, Kalium 2% dan Zinc 1%, selain itu mengandung asam lemak tak jenuh tinggi, minyak dan asam amino sitrulin. (Deshmukh *et al*, 2015)

Kulit semangka mengandung zat sitrulin dengan jumlah sebesar 60% dibandingkan pada daging. Zat ini ditemukan pada semua jenis buah

semangka, namun yang paling tinggi pada jenis semangka kuning. Penelitian menggunakan albedo semangka merah karena lebih murah dan mudah didapatkan. Zat sitrulin akan bereaksi dengan enzim tubuh ketika dikonsumsi, lalu diubah menjadi arginin yang merupakan asam amino non-esensial yang berkhasiat bagi jantung, sistem peredaran darah, dan kekebalan tubuh. Kandungan kulit semangka lainnya yang bermanfaat bagi kesehatan yaitu vitamin, mineral, enzim, dan klorofil (Guoyao, *et.al.*, 2007). Sugiyanta (2011), kulit semangka mengandung sitrulin mencapai 60% atau 24,4 mg/g berat kering, yang merupakan asam amino non-esensial dengan ikatan karbon asimetris yang berperan penting dalam metabolisme dan regulasi NO, serta merupakan molekul bioaktif yang penting dalam berbagai kondisi, baik fisiologis maupun patologis. Sitrulin merupakan asam amino larut air dalam pelarut, hasil dari metabolisme glutamin yang berperan dalam sintesis arginin pada mamalia.

2.4 Ginjal

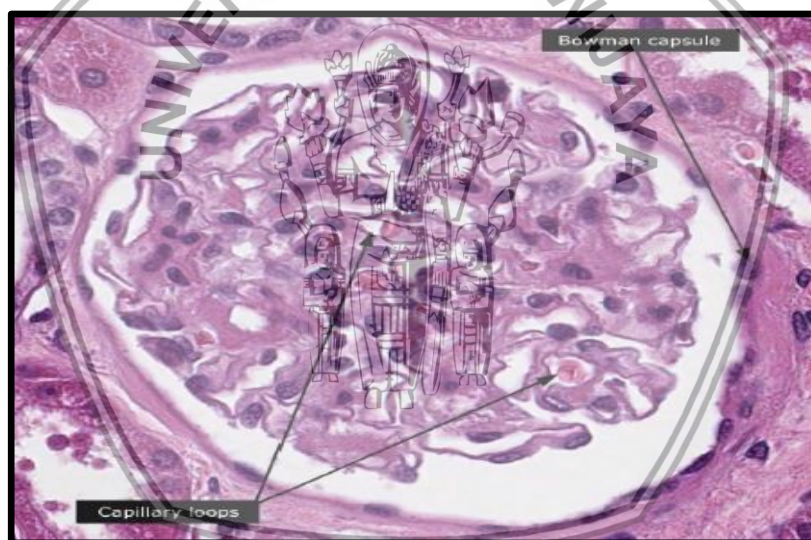
2.4.1 Definisi Ginjal

Ginjal merupakan salah satu organ tubuh yang berperan dalam menyaring darah dan membuang zat-zat yang tidak diperlukan oleh tubuh serta menjaga keseimbangan cairan dalam tubuh. Secara makroskopis, organ ginjal dengan potongan memanjang memberi dua gambaran dua daerah yang jelas. Daerah perifer yang terlihat lebih gelap disebut korteks, dan daerah yang lebih cerah disebut dengan medula. Sedangkan secara mikroskopis,

pada korteks yang gelap terlihat garis diantara jaringan medula yang disebut dengan *medullary rays*. Korteks disekitar garis medula disebut labirin korteks. Medula terlihat lebih cerah dan tampak adanya pembuluh darah (Juhiriyah, 2008). Histologi normal dari glomerulus ginjal dapat dilihat pada Gambar 2.2.

Gambar 2.2 Histologi normal glomerulus ginjal (Uhlen *et al.*, 2015)

Ginjal tersusun atas tiga unsur utama yaitu glomerulus, tubulus dan interstitium. Glomerulus merupakan pembuluh kapiler yang berfungsi untuk



proses

penyaringan. Kapiler glomerulus berbatasan dengan sel-sel endotel dengan sitoplasma tipis yang terdapat banyak lubang (*fenestra*). Pada sel endotel glomerulus dan lamina basalis terdapat sel-sel mesangial (Alatas dkk., 2002). Glomerulus berada didalam *kapsula bowman* yang terdiri atas sel epitel pipih selapis. Ruang antara glomerulus dan kapsula bowman berfungsi menampung urin primer dan selanjutnya urin akan dialirkan menuju tubulus kontortus proksimal (Guyton, 2005).

Ginjal merupakan salah satu sistem detoksifikasi utama setelah hati, dengan membuang racun tubuh yang telah dilarutkan dalam air oleh hati agar dapat dibawa oleh darah, kemudian dibuang bersama kelebihan cairan tubuh melalui urin. Ginjal berfungsi mempertahankan kadar cairan dan elektrolit tubuh, mengatur tekanan darah, mengatur keseimbangan asam basa, dan juga berfungsi sebagai organ endokrin (Verdiansah, 2016).

2.4.2 Anatomi dan Fungsi Ginjal

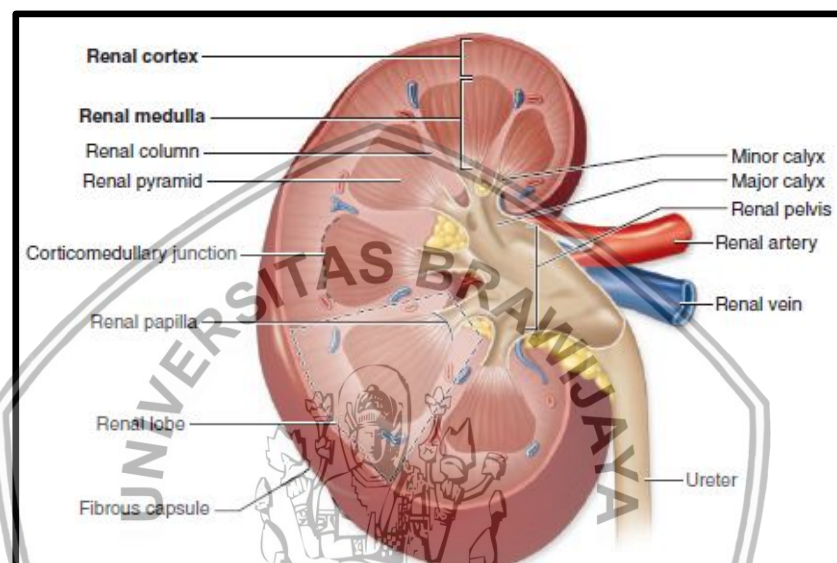
Ginjal merupakan organ yang diselubungi *capsula renalis* dan memiliki beberapa bagian. Bagian luar ginjal adalah *korteks renalis* yaitu bagian yang banyak ditemukan *renal corpuscles* dan beberapa bagian dari tubulus, dan bagian dalamnya adalah medulla renalis yang terdiri dari tubulus-tubulus. Permukaan anterior dan posterior, kutub atas dan bawah serta tepi lateral ginjal berbentuk cembung, sedangkan sisi medialnya berbentuk cekung dan dinamakan hilus. Hilus adalah tempat masuk saraf, keluar masuknya pembuluh darah dan pembuluh limfe serta keluarnya ureter. Ujung atas ureter yang disebut pelvis renalis, terbagi menjadi dua atau tiga kaliks major. Area yang mengelilingi kaliks, disebut sinus renalis biasanya mengandung jaringan adiposa (Mescher, 2013).

Setiap ginjal terdiri dari jutaan unit fungsional yang disebut nefron. Selama 24 jam, nefron dapat menyaring 170 liter darah. Nefron merupakan unit fungsional ginjal yang mampu membuang komponen yang tidak diperlukan dari darah. Nefron terdiri dari *renal corpuscle* sebagai tempat

filtrasi darah dan tubulus renalis yang mengabsorpsi dan sekresi cairan. Renal corpuscle terbagi menjadi dua bagian *kapsula bowman* dan glomerulus, sedangkan tubulus renalis dibagi menjadi tubulus kontortus proximal, *loop henle*, tubulus kontortus distal, dan tubulus konektivus (Mescher, 2013).

3

4



Gambar 2.3 Anatomi ginjal (Mescher, 2013).

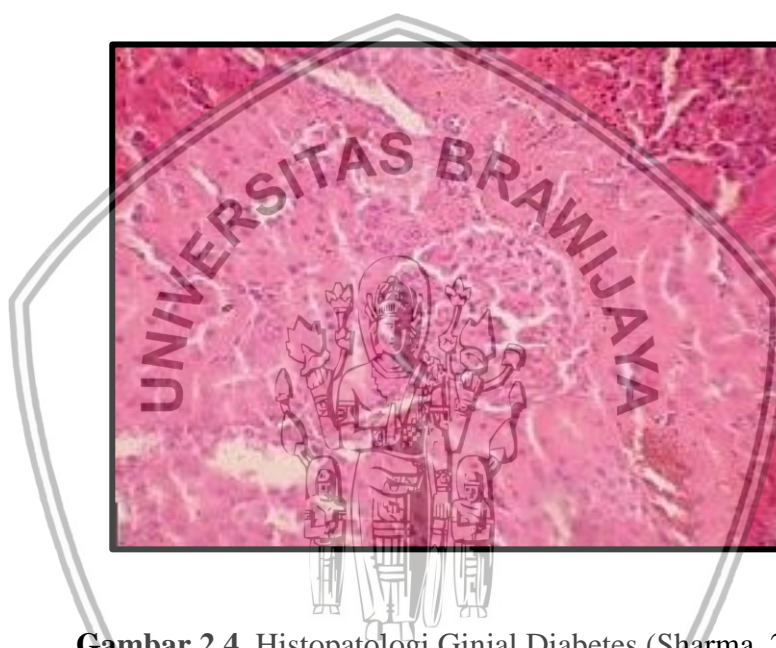
Ginjal berisi darah dari arteri yang mengalir ke kumpulan kapiler ginjal yang berfungsi sebagai penyaring (glomerulus) dan dikelilingi oleh kapsula bowman. Arteri renalis membawa darah murni dari aorta ke ginjal. Glomerulus adalah tempat pertama masuknya darah untuk dilakukan filtrasi. Glomerulus merupakan kapiler yang dilengkapi oleh sel podosit yang berfungsi sebagai filtrasi darah dan barrier darah dengan urin primer. Sel podosit juga berfungsi sebagai regulasi terhadap *Glomerulus Filtration Rate* (GFR). Kapiler glomerulus memiliki sel mesangial yang melekat pada dinding membran basalis kapiler. Sel mesangial juga menghasilkan zat kimia seperti sitokin (Mescher, 2013).

Menurut Mescher (2013) dalam kondisi normal glomerulus terdiri dari *glomerulus membran basement* (GBM) yaitu membran yang menutupi sel endotel dinding pembuluh darah, membran basalis dan podosit. Kapiler glomerulus terletak di antara dua arteriol aferen dan eferen, dua arteriol yang memungkinkan terjadinya peningkatan tekanan hidrostatik, dan menyebabkan pergerakan plasma pada glomerulus. Selain kapiler sel endotel dan podosit, sel-sel ginjal juga mengandung sel-sel mesangial. Sel mesangium memiliki beberapa fungsi seperti: menjaga tekanan hidrostatik, sebagai sel fagositosis yaitu menfagositosis agregat protein yang melewati filter glomerulus, termasuk kompleks antigen-antibodi, dan sebagai sekresi yaitu sel yang mensintesis dan mensekresikan beberapa sitokin, prostaglandin dan faktor-faktor lain yang penting untuk pertahanan kekebalan tubuh dan perbaikan di glomerulus, hal ini sesuai dengan pernyataan Kumar (2007) glomerulus yang tidak mengalami kerusakan memiliki sel yang normal dan padat sehingga penurunan jumlah sel dan pelebaran glomerulus tidak terjadi.

2.4.3 Pengaruh DM pada Ginjal

Kondisi hiperglikemia mengakibatkan terbentuknya AGEs yang dapat meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga timbul keadaan stres oksidatif. Radikal bebas menginduksi kerusakan jaringan pada ginjal (Wang *et al*, 2011). Komponen pada ginjal seperti sel endothel glomerulus, sel mesangial, sel podosit dan epitel tubulus juga mengalami kerusakan disebabkan adanya kondisi hiperglikemia. Hiperglikemia juga

menginduksi terjadinya hemodinamik intraglomerular, hiperfiltrasi dan kekacauan metabolik (Kanwar *et al*, 2012). Peningkatan ROS pada kondisi hiperglikemia dapat memicu terjadinya ikatan ROS dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada *fosfolipid bilayer* sehingga terjadi peroksidasi lipid dan merusak struktur membran sel pada ginjal serta terjadinya inflamasi pada (Kamble *et al*, 2015).



Gambar 2.4. Histopatologi Ginjal Diabetes (Sharma, 2014).

Kadar glukosa dalam darah yang tinggi menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histologi dari glomerulus ginjal yaitu piknosis, karioreksis, dan glomerulus keseluruhannya tidak tertutup oleh *kapsula bowman*, terjadi poliferasi sel yang menyebabkan peningkatan tarikan dan tekanan mesangial sehingga mesangium glomerular mengembang dan terjadi hipertrofi yang menstimulasi pelebaran glomerulus. Mekanisme kerusakan ginjal karena diabetes salah satunya dipengaruhi oleh jalur hiperglikemia (Breyer, 1992).

2.5 Interleukin 1 β (IL-1 β)

Sitokin adalah mediator (berupa protein atau glikoprotein dengan berat molekul 8-80kDa) yang dihasilkan oleh sel dalam reaksi radang atau imunologik yang berfungsi sebagai isyarat antara sel-sel untuk membentuk jaringan komunikasi dalam respon imun, yang termasuk dalam sitokin adalah berbagai interleukin (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-13), interferon (IFN α , β , dan γ), faktor nekrosis tumor (tumour necrosis factor, TNF), faktor perangsang koloni (colony stimulating factor, CSF) dan khemokin (Ishartadiati, 2008).

Sitokin yang berperan pada proses inflamasi pertama kali ialah TNF- α dan IL-1 (Abbas *et al.*, 2007). Interleukin-1 merupakan mediator kunci dari respon tubuh terhadap invasi mikroba, reaksi imunologi dan cedera jaringan. Interleukin-1 terdiri dari 2 peptida yaitu α dan β yang memiliki aktivitas yang identik. Interleukin 1 α terikat di membran sedangkan interleukin-1 β (IL-1 β) yang disekresikan dan ditemukan di dalam sirkulasi merupakan bentuk IL-1 terbanyak (Irsyandi, 2008). IL-1 selain diproduksi dari monosit atau makrofag, juga terdapat di dalam sel lain seperti pada corneal epithelium, sel mukosa mulut, neutrofil, sel endotelial (Kusumadewi, 2012).

Fungsi utama dari interleukin-1 β sebagai mediator inflamasi yang merupakan respon terhadap infeksi dan rangsangan lain. Interleukin-1 β bersama dengan sitokin lain berperan pada respon imunitas non spesifik (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013).

Sitokin ini berperan sebagai sitokin proinflamasi yang diproduksi sebagai respon dari kerusakan jaringan. Reaksi tersebut antara lain infiltrasi neutrofil ke jaringan, migrasi makrofag, dan produksi sitokin proinflamasi lain (Patel, *et al.*, 2003). Interleukin-1 β bekerja pada endotel dengan menginduksi eksresi *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1). Neutrofil, monosit dan limfosit kemudian mengenali molekul adhesi tersebut dan bergerak ke dinding pembuluh darah yang rusak selanjutnya ke jaringan luka (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013). Menurut Singh *et al.* (2014), dalam keadaan normal sitokin dapat menstimulasi respon individu dengan mengontrol stress oksidatif dan meminimalkan kerusakan jaringan. Peningkatan IL-1 β disebabkan oleh radikal bebas sehingga antioksidan dan oksidatif didalam organ mengalami ketidakseimbangan atau disebut stress oksidatif.

Peningkatan ekspresi IL-1 β menimbulkan reaksi dari sel-sel proinflamasi seperti infiltrasi neutrofil ke jaringan, migrasi makrofag dan produksi sitokin proinflamasi yang lain (Fujiwara and Kobayashi, 2005). Interleukin juga berperan dalam fase proliferasi dan maturasi dalam penyembuhan luka. Selain TGF- β dan FGF, desposisi dan remodeling kolagen juga dikendalikan oleh berbagai proteinase yang mendegradasi kolagen. Pada fase inflamasi, makrofag yang teraktivasi menghasilkan TNF- α kemudian menginduksi makrofag untuk menghasilkan IL-1 β yang berperan sebagai mitogenik fibroblas dan ekspresi MMP-9 untuk degradasi

kolagen. Degradasi kolagen tersebut juga berperan untuk menstimulasi peningkatan proliferasi fibroblas (Mittal *et al.*, 2008). Peningkatan ekspresi IL-1 β juga menunjukkan adanya inflamasi yang terjadi pada jaringan karena perannya sebagai sitokin proinflamasi (Ren and Torres, 2009). Inflamasi kronis mengakibatkan kerusakan jaringan secara terus menerus sehingga menyebabkan terjadinya penumpukan ECM dan akhirnya menyebabkan fibrosis (Liu, 2006).

2.6 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan laboratorium atau hewan percobaan dapat digunakan sebagai media dalam penelitian atau pengamatan laboratorik untuk mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan. Penelitian mengenai diabetes melitus pada hewan percobaan dapat dilakukan dengan menggunakan senyawa kimia yang bersifat diabetogenik (*Streptozotocin*). Salah satu hewan coba yang sering digunakan untuk penelitian diabetes melitus yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Etuk, 2010).

Klasifikasi tikus sebagai hewan coba dalam penelitian ini adalah sebagai berikut (Suckow *et al.*, 2006):

Kingdom	: Animalia
Class	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 2.5 Hewan coba Tikus *Rattus norvegicus* (Janvier Labs, 2004)

Tabel 2.2 Data biologis Tikus

Temperatur tubuh	99.9°F	37.7°C
Pulsus	300-500 bpm	-
Respirasi	70-150 bpm	-
Berat badan	Jantan dewasa	267-500 g
	Betina dewasa	225-325 g
Rata-rata masa hidup	2.5-3.5 tahun	Tikus betina memiliki masa hidup yang lebih panjang
Kematangan seksual	37-75 hari	-
Gestasi	21-23 hari	-
Berat lahir	5-6 g	-
Jumlah kotoran	6-13	-
Umur sapih	21 hari	-
Suhu lingkungan yang cocok	50-68°F	18-26°C
Kelembaban lingkungan yang cocok	40-70%	-
Kebutuhan air	22-33 mL/hari	-

Sumber: (Pollock, 2010).

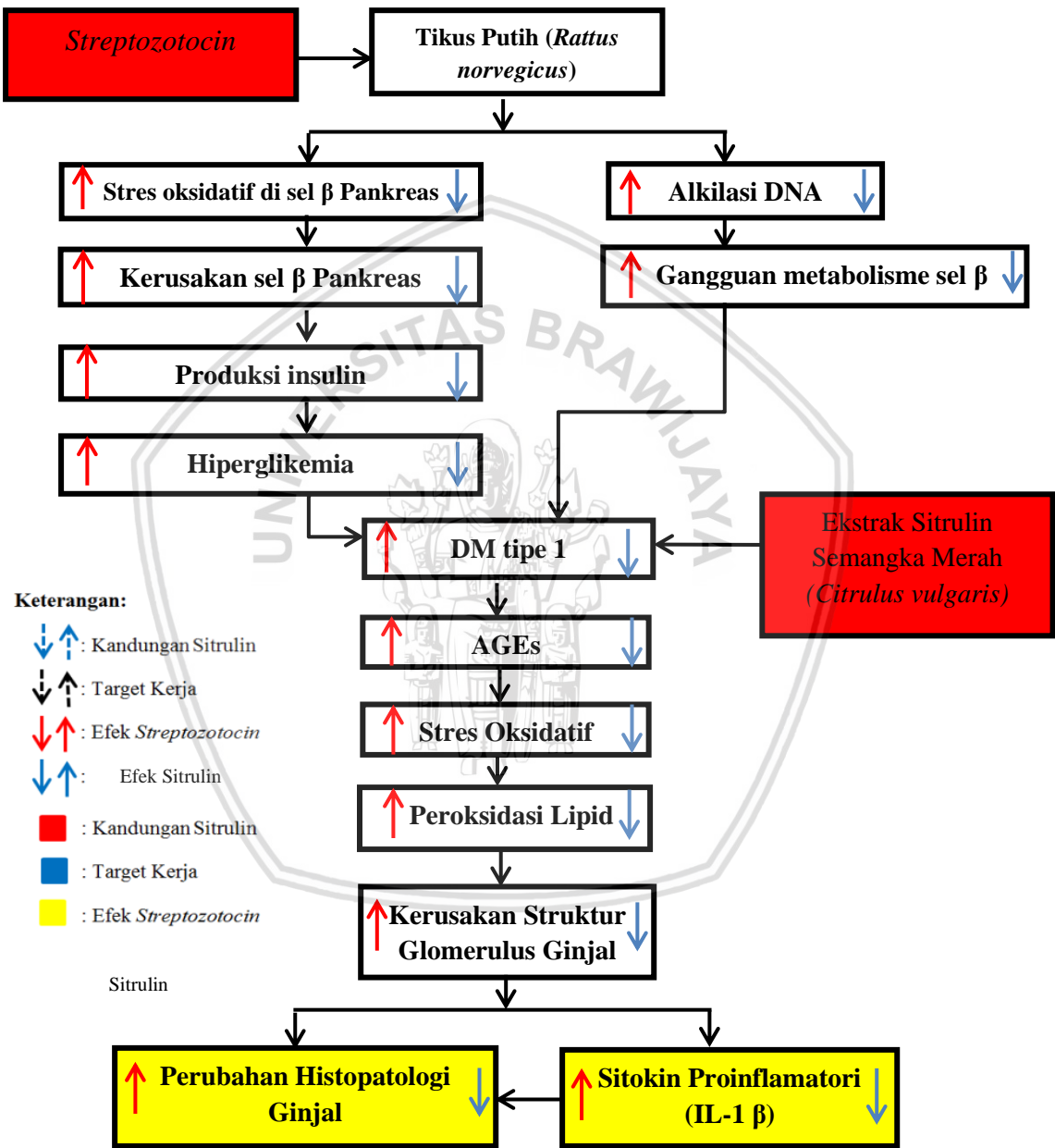
Penggunaan tikus putih *Rattus norvegicus* banyak dilakukan karena mudah diperoleh, memiliki sifat respon biologik dan adaptasi yang mirip dengan manusia, mudah untuk dikendalikan, mudah dipelihara dan perawatannya yang mudah sehingga membantu dalam penelitian (Widyastuti, 2000). Tikus yang

diberikan induksi *streptozotocin* dikatakan mengalami diabetes melitus ketika sudah terjadi hiperglikemia pada tubuh dengan kadar gula darah 150-500 mg/dl (Etuk, 2010). Tikus putih *Rattus norvegicus* juga mudah diperoleh dalam jumlah banyak, memiliki respon cepat, memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi, dan memiliki harga relatif murah (Sihombing dkk, 2011).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Mekanisme Kerja *Streptozotocin* dan Sitrulin

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit gangguan sistem endokrin yang ditandai dengan keadaan hiperglikemia atau peningkatan kadar glukosa dalam darah. Kadar glukosa yang tinggi pada keadaan DM disebabkan oleh penurunan produksi insulin. Produksi insulin yang menurun disebabkan oleh kerusakan sel-sel β pankreas, keadaan ini disebut dengan DM tipe I. Pembuatan hewan model diabetes melitus tipe I pada penelitian ini adalah dengan menginduksi senyawa diabetogenik yaitu *streptozotocin* (STZ) ke tubuh tikus. *Streptozotocin* sebagai agen radikal bebas memiliki peran penting dalam kerusakan sel β pankreas.

STZ merupakan senyawa toksik yang selektif pada pulau langerhans pankreas. STZ diketahui dapat menyebabkan kematian secara spesifik sel β pankreas dan menginduksi DM. STZ diinduksikan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) *intra-peritoneal* (IP) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut (*Multi Low Dose-streptozotocin*). STZ merupakan donor NO dan dapat menembus sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT 2. STZ juga mampu membangkitkan oksigen reaktif (ROS) yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif secara signifikan menurunkan level antioksidan protektif dalam tubuh seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), katalase dan vitamin E. Aksi STZ intra-seluler menghasilkan penambahan DNA sel β pankreas dengan cara alkilasi. Alkilasi *Deoxyribose Nucleid Acid* (DNA) oleh STZ melalui gugus nitrosourea menyebabkan terhambatnya siklus krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria yang mengakibatkan kerusakan sel β

pankreas. Kemampuan sel β pankreas dalam memproduksi insulin berkurang seiring waktu dan menyebabkan kondisi hipoinsulinemia. Glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel tubuh sehingga terjadi peningkatan jumlah glukosa darah yang disebut hiperglikemia.

Hiperglikemia mengakibatkan pembentukan *Advanced Glycation End Products* (AGEs) yang merupakan sumber *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan berlanjut pada kondisi stres oksidatif secara sistemik. Stres oksidatif mengakibatkan kerusakan pada sel ginjal. ROS masuk ke dalam sel melalui membran *fosfolipid bilayer* dan terjadi peroksidasi lipid yang berakibat pada kerusakan DNA dan metabolisme dalam mitokondria sel ginjal. Kerusakan tersebut memacu sel pada ginjal dalam memproduksi sitokin proinflamatori interleukin-1 β (IL-1 β). IL-1 β diproduksi oleh sel intrinsik ginjal seperti sel mesangial, endothelial dan dendritik. Disisi lain, penurunan dari produksi insulin yang mengakibatkan hiperglikemia yang berpengaruh pada kerja ginjal. Tingginya kadar gula dalam darah akan membuat struktur ginjal berubah sehingga fungsinya terganggu, hal ini disebabkan jumlah glukosa pada darah yang akan difiltrasi oleh glomerulus meningkat sehingga cairan darah yang terdapat pada kapiler darah akan mengental, tekanan darah semakin tinggi dan mengakibatkan kapiler-kapiler darah pada glomerulus akan membesar, akan terjadi penebalan pada glomerulus sehingga terjadi kerusakan pada glomerulus yang berfungsi sebagai penyaring darah. Kerusakan glomerulus tersebut berupa penebalan membran basalis dan menjadi bocor sehingga protein yang berukuran kecil maupun besar dapat

lolos dan terjadi albuminuria. Perubahan histopatologi pada ginjal berupa adanya kerusakan dan penebalan dari glomerulus dan terjadi peningkatan jumlah mediator respon proinflamatori yaitu IL-1 β .

Terapi yang diberikan dalam penelitian ini adalah terapi herbal dengan menggunakan bagian kulit semangka merah (*Citrullus vulgaris*) yang berwarna putih atau biasa disebut dengan albedo selama ini hanya dianggap limbah dan dibuang memiliki potensi sebagai agen terapi untuk penyakit DM. Kandungan utama albedo semangka (*Citrullus vulgaris*) adalah sitrulin yang mencapai 60% atau 24,4 mg/g berat kering. Sitrulin merupakan asam amino non-esensial dengan ikatan karbon asimetris yang berperan penting dalam metabolisme dan regulasi *Nitric Oxide* (NO) dalam memicu pembentukan arginin. Arginin meningkatkan jumlah NO endotelial, yang secara langsung berperan dalam regulasi sekresi insulin melalui mekanisme transport membran. Sitrulin sebagai antioksidan memiliki manfaat alami untuk melindungi tubuh dari radikal bebas. Pemberian antioksidan terbukti dapat menangkap radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif sebagai penyebab komplikasi pada DM.

Sitrulin yang terkandung dalam albedo semangka dapat menghambat kerusakan ginjal yang diakibatkan oleh DM tipe I pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diinduksi dengan STZ, hal ini ditandai dengan tidak ada kerusakan endotel dan sitrulin memiliki efek untuk menghambat reaksi inflamasi jaringan sehingga sitokin proinflamatori seperti IL-1 β tidak dilepaskan. Kandungan sitrulin dalam ekstrak albedo *Citrullus vulgaris*

diharapkan mampu menurunkan kadar radikal bebas pada hewan coba DM tipe I, sehingga ekspresi imunohistokimia IL-1 β dan menurunkan tingkat kerusakan glomerulus ginjal dapat diturunkan dengan adanya antioksidan pada sitrullin.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian berdasarkan rumusan masalah yaitu:

1. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dapat menghambat kerusakan pada ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) model DM tipe I yang diinduksi *streptozotocin*.
2. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dapat menurunkan ekspresi IL-1 β pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model DM tipe I yang diinduksi *streptozotocin*.

BAB 4 METODELOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan April - Mei 2017 di beberapa laboratorium antara lain:

- Perawatan, perlakuan dan euthanasia hewan coba akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Proses ekstraksi albedo semangka merah (*Citrulus vulgaris*) dilakukan di UPT. Materia Medika Batu.
- Pembuatan preparat histopatologi ginjal dengan pewarnaan HE dilakukan di Laboratorium Patologi Kesima Medika Malang dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pewarnaan imunohistokimia.
- Pengamatan preparat histologi akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus, spuit *tuberculin* 1 cc, *blender*, timbangan digital, pot organ, kertas label, hand gloves, masker, *beaker glass*, oven, spidol marker, sonde, kapas, *scalpel*, gunting, pinset, pot spesimen, tabung *eppendorf*, spuit 5 cc, *object*

glass, mikroskop *Olympus BX51*[®], mikropipet, *yellow tip*, sentrifugator, dan *glucotest* (*glucostick* dan glukometer *GlucoDr*TM).

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus putih (*Rattus novergicus*) sehat galur Wistar usia 8-12 minggu dengan berat rata-rata 200 gram, kulit semangka merah (*Citrullus vulgaris*) serbuk, *Streptozotocin* MW 265.22, NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, formalin 40%, aquades, asam asetat, pelarut etanol 70%, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%, 100%), *xylol*, H₂O₂, antibodi primer rat *Anti IL-1 β* (H-153:SC-7884), antibodi sekunder *Rabbit Anti rat IgG biotin labeled* (Dako-USA), SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radis Peroxidase*), DAB (*Diaminobenzidine*), PBS pH 7,4, FBS, paraffin, Na₂CO₃, dan pewarna histologi *Hematoksilin-Eosin*.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Pembuatan hewan model DM tipe I
3. Pembuatan dan perhitungan dosis ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*)
4. Pemeriksaan kadar gula darah
5. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*)
6. Pengambilan organ ginjal
7. Pembuatan pembuatan preparat histopatologi ginjal dengan pewarnaan imunohistokimia

8. Pembuatan preparat histopatologi ginjal dengan pewarnaan HE
9. Perhitungan ekspresi imunohistokimia IL-1 β

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Model eksperimental yang dipakai yaitu *Posttest only control group design*. Rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada tabel (**Tabel 4.1**).

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Hewan Coba

No.	Kelompok	Keterangan
1	KN (Kontrol Negatif)	Kelompok hewan sehat tanpa induksi STZ dan tanpa terapi ekstrak albedo semangka merah (<i>Citrulus vulgaris</i>)
2	KP (Kontrol Positif)	Kelompok hewan yang diinduksi (i.p) STZ dengan dosis 20mg/kk BB
3	P1	Kelompok hewan tikus DM tipe I yang diinduksi (i.p) STZ dan diberi terapi ekstrak albedo semangka merah dosis 500 mg/kg BB
4	P2	Kelompok hewan tikus DM tipe I yang diinduksi (i.p) STZ dan diberi terapi ekstrak albedo semangka merah dosis 1000 mg/kg BB
5	P3	Kelompok hewan tikus DM tipe I yang diinduksi (i.p) STZ dan diberi terapi ekstrak albedo semangka merah dosis 1500 mg/kg BB

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : Dosis *streptozotocin* dan dosis ekstrak albedo semangka merah (*Citrulus vulgaris*).
- Variabel tergantung : Ekspresi IL-1 β dan gambaran histopatologi ginjal.
- Variabel kontrol : Homogenitas Tikus (*Rattus norvegicus*): galur wistar, jenis kelamin, umur, berat badan, lingkungan, suhu kandang, pakan dan air minum.

Sampel penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan, galur *Wistar*, berumur 8-12 minggu, dengan berat badan 150 gram. Hewan coba dipersiapkan dan diadaptasi (aklimatisasi) selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Perkiraan besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011).

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p : jumlah kelompok hewan coba

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.4.2 Pembuatan Hewan Model Diabetes Melitus Tipe I

Tikus putih jantan, galur *Wistar* sejumlah 20 ekor, dengan umur 8-12 minggu, diukur kadar glukosa pasca aklimatisasi menggunakan *glucometer* pada semua kelompok perlakuan. Pemberian injeksi *streptozotocin* pada kelompok KP, P1, P2, dan P3. Dosis yang digunakan sebesar 20 mg/kg BB melalui *intra-peritoneal* (i.p) selama lima hari berturut-turut (*Multi Low Dose streptozotocin*), mulai hari ke-8 hingga hari ke-12 dan ditunggu selama 14 hari. Pada proses diabetes melitus, dilakukan pengukuran kadar glukosa setiap seminggu sekali untuk memastikan tikus putih (*Rattus norvegicus*) telah mengalami kenaikan kadar glukosa. Kadar glukosa normal pada tikus sebesar ≤ 126 mg/dl. Kejadian diabetes melitus pada tikus ditandai dengan kadar glukosa > 300 mg/dl. (Aulanni'am *et.al.*, 2005).

4.4.3 Pembuatan Ekstrak dan Perhitungan Dosis Ekstrak Albedo Semangka

Merah (*Citrullus vulgaris*)

Pembuatan ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) ini dengan menggunakan metode maserasi. Pembuatan ekstrak sitrulin dimulai dengan mencuci bersih albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dan dipotong tipis-tipis, kemudian ditimbang sebanyak 2 kg. Dihaluskan menggunakan blender dengan ditambahkan pelarut metanol. Bahan yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut metanol sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat bahan). Tutup toples dengan rapat selama 72 jam. Dishaker diatas

shaker digital dengan kecepatan 50 rpm (rotasi per menit). Ekstrak cair disaring dengan kertas saring dan ditampung dalam erlenmeyer. Hasil ekstrak cair kemudian diuapkan dengan rotary evaporator selama kurang lebih 1 jam 30 menit. Ekstrak yang dihasilkan diuapkan kembali di atas penangas air selama 2 jam.

Penentuan dosis efektif ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) merupakan hasil modifikasi dosis penelitian yang pernah diteliti oleh Sugiyanta (2011). Pada penelitian ini, dosis yang digunakan dibedakan menjadi 3, yaitu dosis 1 (500 mg/kg BB), dosis 2 (1000 mg/kg BB), dan dosis 3 (1500 mg/kg BB).

4.4.4 Pemeriksaan Kadar Gula Darah

Pemeriksaan kadar glukosa dilakukan setiap tujuh hari sekali. Kadar glukosa diukur dengan menggunakan *glucotest* (strip glukometer dan glukometer *GlucoDrTM*). Darah didapatkan dari pembuluh darah pada bagian ujung ekor hewan model, yang sebelumnya dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian diurut secara perlahan, selanjutnya ujung ekor ditusuk dengan menggunakan jarum kecil (*syringe 1ml*). Darah yang keluar, disentuhkan pada bagian strip *glucometer*. Hasil akan terbaca di layar *GlucoDrTM* dinyatakan dalam mg/dl.

4.4.5 Pemberian Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*)

Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) merupakan hasil modifikasi dosis yang pernah diteliti oleh Sugiyanta (2011)

yang dilakukan selama 14 hari sesuai dengan dosis yang telah ditentukan, yaitu dosis 1 (500 mg/kg BB), dosis 2 (1000 mg/kg BB), dan dosis 3 (1500 mg/kg BB) diencerkan dengan akuades agar mudah untuk disondekan (Modifikasi Sugiyanta, 2011).

4.4.6 Isolasi Organ Ginjal

Langkah awal yang dilakukan sebelum isolasi ginjal adalah melakukan euthanasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*). Euthanasi hewan coba dengan cara dislokasi leher kemudian tikus diletakkan pada posisi rebah dorsal dan dilakukan pembedahan pada rongga abdomen dengan tujuan untuk mengambil sampel organ ginjal. Sampel ginjal yang diperoleh, dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% bertujuan untuk menghilangkan darah. Setelah organ diambil kemudian diincisi secara melintang searah organ lalu diletakkan pada pot organ yang telah diberi formalin 10% (Sofia dkk., 2013).

4.4.7 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Sampel organ ginjal yang diambil dibuat preparat histopatologi. Proses pembuatan preparat histopatologi menurut Jusuf (2009) terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan (*clearing*), *embedding*, *blocking*, pemotongan (*mounting*) dan penempelan di *object glass* serta pewarnaan.

a. Fiksasi

Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologis dan histologis, serta mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Fiksasi dilakukan dengan cara dimasukkan kedalam larutan formalin 10%.

b. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan langkah kedua dalam pemrosesan jaringan. Proses ini bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi, sehingga jaringan nanti dapat diisi dengan parafin. Dehidrasi dilakukan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam serta etanol 90%, 95%, dan absolut selama 20 menit.

c. Penjernihan (*Clearing*)

Untuk melakukan penjernihan, jaringan dipindahkan dari alkohol absolut ke larutan penjernihan, yaitu xylol I selama 30 menit dan xylol II selama 30 menit. Xylol pada proses ini berfungsi sebagai penghenti proses dehidrasi

d. *Embedding*

Embedding adalah proses untuk mengeluarkan cairan penjernih (*clearing agent*) dari jaringan dan diganti dengan parafin. Pada tahap ini jaringan harus bebas dari cairan penjernih karena sisa cairan penjernih dapat mengkristal dan ketika dipotong dengan mikrotom akan menyebabkan jaringan menjadi mudah robek. *Embedding* dilakukan

dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C.

Jaringan dimasukkan dalam parafin cair sampai memadat.

e. *Blocking*

Pengecoran (*Blocking*) adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Proses ini menggunakan cetakan dari plastik (*histoplate*) dan piringan logam. *Histoplate* diletakkan di atas piringan logam dan sedikit cairan parafin dituang ke dalam cetakan tersebut. Jaringan dimasukkan dengan cepat menggunakan pinset yang telah dipanaskan dan posisi jaringan diatur di dalam cetakan. Parafin cair kemudian dituang kembali hingga menutupi seluruh cetakan tersebut.

f. Pemotongan (*Sectioning*) dan Penempelan (*Mounting*) pada *Object Glass*

Cetakan yang sudah membeku kemudian diletakkan dalam penjepit mikrotom dan dipotong dengan ketebalan $\pm 5 \mu\text{m}$. Jaringan dipotong untuk merapikan bagian yang tidak terpotong secara sempurna pada awal pemotongan. Selanjutnya, direndam dalam *water bath* untuk menghilangkan kerutan halus preparat dengan suhu 40°C, dikeringkan pada suhu 20-27°C. Jaringan yang sudah kering ditempelkan pada *object glass* lalu dikeringkan di dalam inkubator dengan suhu 38-40°C selama 24 jam lalu siap diwarnai dengan HE.

g. Pewarnaan HE

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksin untuk memberi warna pada inti sel dan memberikan warna biru (basofilik), serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung, sehingga memberikan warna merah muda. Langkah pewarnaan HE meliputi:

- Proses deparafinasi dengan menggunakan xylol I dan II selama 5 menit
- Proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit.
- Pencucian sediaan dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit.
- Pewarnaan dengan pewarna *hematoxylin* selama 10 menit kemudian dicuci dengan air selama 1 menit dan akuades selama 5 menit.
- Pewarnaan dengan pewarna *eosin* selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 1 menit.
- Dehidrasi dengan etanol 80%, 90%, dan 95% selama 5 menit.
- Pengeringan sediaan dan pelapisan (*mounting*) dengan menggunakan *entellan*.

4.4.8 Pembuatan dan Perhitungan Ekspresi IL-1 β

Tahap awal imunohistokimia adalah deparafinasi, yaitu preparat direndam dalam larutan xylol (2 kali), etanol absolut (2 kali), alkohol 80%,

alkohol 70%, dan akuades steril masing-masing selama 2 menit. Setelah itu, disimpan selama 24 jam dalam suhu 4°C. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit) lalu direndam dalam 3% *Hidrogen Peroksida* (H₂O₂) selama 10 menit (dalam PBS), dan dicuci kembali dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit), lalu direndam dalam 1% BSA (dalam PBS) selama 1 jam pada suhu ruang. Preparat ditetesi dengan antibodi primer *rat Anti IL-1β* (H-153:SC-7884) (dalam BSA 1% dalam PBS) 1:100 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Preparat dikeluarkan dari *refrigerator* dan dibiarkan selama 30 menit dalam suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Ditambahkan antibodi sekunder *Rabbit Anti rat IgG biotin labeled* dalam PBS (1:200) selama 1 jam pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Ditambahkan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radsih Peroxidase*) dalam PBS (1:500) selama 40 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Kromogen DAB (3,3-*diaminobenzidine tetrahydrochloride*) ditambahkan selama 20 menit pada suhu ruang lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). *Counter stain* (*Hematoxylin Eosin*) 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, dilakukan *mounting* dengan *etellen* kemudian ditutup dengan *cover glass* (Ramos-Vara, 2005).

Pewarnaan imunohistokimia bertujuan untuk menghitung presentasi ekspresi IL-1β pada ginjal. Preparat jaringan ginjal yang telah dilakukan pewarnaan selanjutnya diamati menggunakan mikroskop (Olympus BX51®) dengan perbesaran 400x. Pengamatan selanjutnya didokumentasikan pada

lima lapang pandang. Analisis hasil immunohistokimia dapat menggunakan *software immunoratio* dimana dilakukan proses pemindaian (*scanning*) preparat. Alat pemindai yang digunakan umumnya terdiri dari mikroskop cahaya untuk memperoleh gambar mikroskopis dari jaringan secara berurutan sehingga seluruh preparat dapat di pindai menggunakan *software immunoratio*. Apabila kompleks antigen-antibodi bereaksi dengan kromogen DAB maka akan menghasilkan endapan berwarna (kromogranin) sehingga menghasilkan produk tervisualisasi yang berwarna coklat (Ramadhani dkk., 2012).

4.5 Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kualitatif deskriptif untuk gambaran histopatologi ginjal dan kuantitatif untuk ekspresi IL-1 β menggunakan *software immunoratio*. Data rata-rata ekspresi IL-1 β yang diperoleh dianalisis dengan ragam *One-way ANOVA* menggunakan *software SPSS 17.0 for Windows* (Statistical Package for Social Science). Apabila antar kelompok perlakuan diperoleh hasil yang berbeda nyata maka dilanjutkan uji BNJ $\alpha = 5\%$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan (Kusriningrum, 2008).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 DM tipe I Hasil Induksi Streptozotocin (STZ)

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan hewan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar yang diberi induksi *Multiple Low Dose Streptozotocin* (MLD-STZ) dosis 20 mg/kg BB dengan rute pemberian intraperitoneal selama 5 hari, setelah 14 hari tikus didiagnosa telah mengalami diabetes melitus tipe I ditandai dengan adanya kenaikan kadar glukosa darah atau mengalami hiperglikemia (180-500 mg/dl) (**Lampiran 10**). Tikus yang didiagnosa diabetes melitus tipe I terlihat kondisi fisik yang lemas dan menjadi kurang aktif bergerak, selain itu tikus juga mengalami peningkatan rasa lapar dan haus yang ditandai dengan pakan dan air minum lebih cepat habis dan disertai sekam yang lebih cepat basah dikarenakan meningkatnya jumlah urin. Gejala-gejala yang muncul pada tikus sesuai dengan pernyataan dari Nelson and Cox (2004), menyebutkan bahwa gejala yang muncul apabila menderita diabetes mellitus adalah meningkatnya kadar glukosa darah (hiperglikemia), meningkatnya rasa haus (polidipsi), meningkatnya frekuensi urinasi (poliuri) dan meningkatnya rasa lapar yang berlebihan (polifagia).

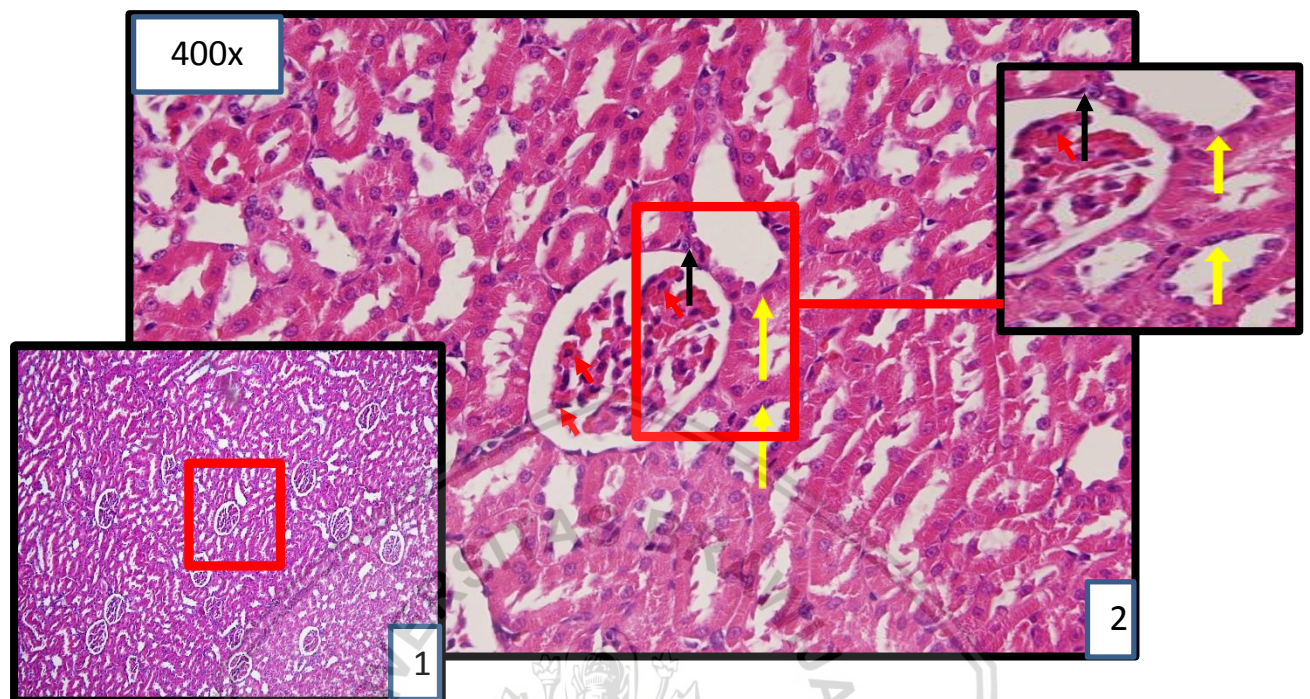
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak *Albedo Citrullus vulgaris* terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Diabetes Melitus Tipe I

Diabetes melitus tipe I merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan kenaikan glukosa darah atau hiperglikemia karena adanya defisiensi

insulin dalam tubuh. Defisiensi insulin dalam tubuh ini disebabkan karena kegagalan sel β pankreas dalam menghasilkan insulin untuk keperluan metabolisme tubuh (Ciobotaru, 2013). Perlakuan diabetes melitus tipe I pada tikus coba dengan induksi *streptozotocin* menyebabkan degenerasi sel β yang ditunjukkan dengan perubahan bentuk inti sel (Denik, 2009).

Pewarnaan hematoxylin eosin (HE) merupakan pewarnaan rutin yang dapat digunakan dalam mengamati struktur histologis ginjal tikus secara umum. Menurut Fischer (2008), pewarnaan HE berguna dalam mengenali adanya perubahan morfologi dari struktur dasar sel atau jaringan, sehingga dapat didiagnosa suatu penyakit. Hematoksilin untuk memberi warna pada inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung sehingga memberikan warna merah muda (Dayatri, 2009). Pengamatan dilakukan dengan membandingkan antar kelompok perlakuan (**Gambar 5.1**) dan dianalisis secara deskriptif. Pengamatan preparat histopatologi ini dilakukan menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 400x dengan mengamati struktur glomerulus. Hasil pewarnaan menunjukkan adanya perbedaan histopatologi ginjal pada masing-masing perlakuan. Hasil pengamatan terhadap gambaran histopatologi ginjal tikus pada masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada **Gambar 5.1**.

Pada kelompok kontrol negatif tanpa diberi perlakuan menunjukkan histologi ginjal normal atau tidak mengalami kerusakan (**Gambar 5.1.A**).

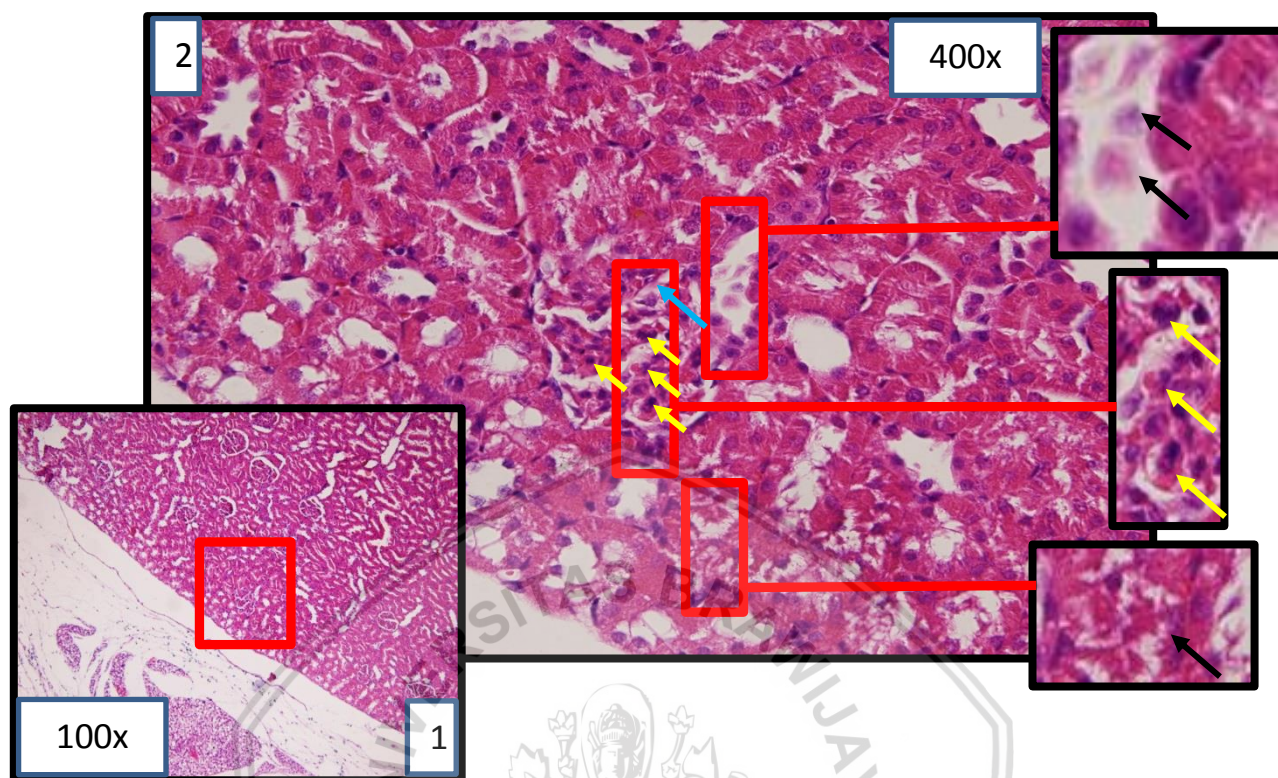


Gambar 5.1.A : Kontrol Negatif (perbesaran 400x). (Panah kuning) Sel epitel kuboid tubulus normal, (Panah hitam) kapsula bowman normal, terdapat sel mesangial dalam jumlah yang sedikit (Panah merah), struktur glomerulus normal.

Secara histologis, ginjal tikus dibagi menjadi dua bagian yaitu korteks dan medulla. Korteks ginjal didominasi oleh glomerulus, tubulus kontortus proksimal dan tubulus kontortus distal. Glomerulus terdiri dari dua pars yaitu *pars parietal* dan *pars visceral*, dimana pada *pars parietal* terdiri dari susunan kapsula bowman dan pada *pars visceral* terdiri dari tiga bagian yaitu endothelium kapiler, membran basalis, dan sel epitel, sedangkan medula ginjal didominasi oleh *loop henle* dan duktus kolektivus (Mescher, 2013). Gambaran histologi ginjal kelompok kontrol negatif dapat diamati kapsula bowman yang masih utuh dengan epitel squamus simpleks dan inti berada ditengah sel, *bowman space* terlihat jelas. Tubulus proximal dan

distal yang masih utuh dengan epitel kuboid simpleks tersusun rapat, jelas dan teratur dengan inti ditengah serta lumen tubulus. Sel mesangial merupakan sel penyusun glomerulus yang berfungsi sebagai penyokong struktur kapiler glomerulus, mengatur kontraksi dalam respon perubahan tekanan darah guna menjaga laju filtrasi, memfagositosis agregat protein yang menempel pada glomerulus, dan sekresi faktor pertahanan dan perbaikan glomerulus. Keberadaan sel mesangial yang tidak menyebar ke seluruh bagian glomerulus dengan sitoplasma berwarna merah cerah dengan inti bulat di tengah. Sel epitel tubulus berbentuk kuboid simpleks tersusun rapat dan teratur dengan inti di tengah dan lumen tubulus (Mescher, 2013). Histopatologi ginjal kelompok kontrol positif menunjukkan beberapa perubahan, dengan perbesaran 100x, 400x dan 1000x hal ini menunjukkan efek induksi *Streptozotocin* yang merusak sel β pankreas sehingga terjadi peningkatan kadar gula darah dan secara langsung dapat menyebabkan stress oksidatif. Radikal bebas dapat menginduksi kerusakan pada ginjal berupa kerusakan sel epitel dan jaringan (Pinto *et al.*, 2012).

Gambaran histopatologi ginjal kelompok kontrol positif DM terlihat adanya kerusakan struktur pada glomerulus dan tubulus. Kerusakan pada glomerulus ditandai dengan terlepasnya glomerulus dari kutub vaskuler dan tubuler, erosi epitel kapsula bowman pars parietal, ekspansi sel mesangial, erosi epitel tubulus serta struktur glomerulus yang tidak utuh dengan batas yang tidak beraturan seperti pada **Gambar 5.1.B**



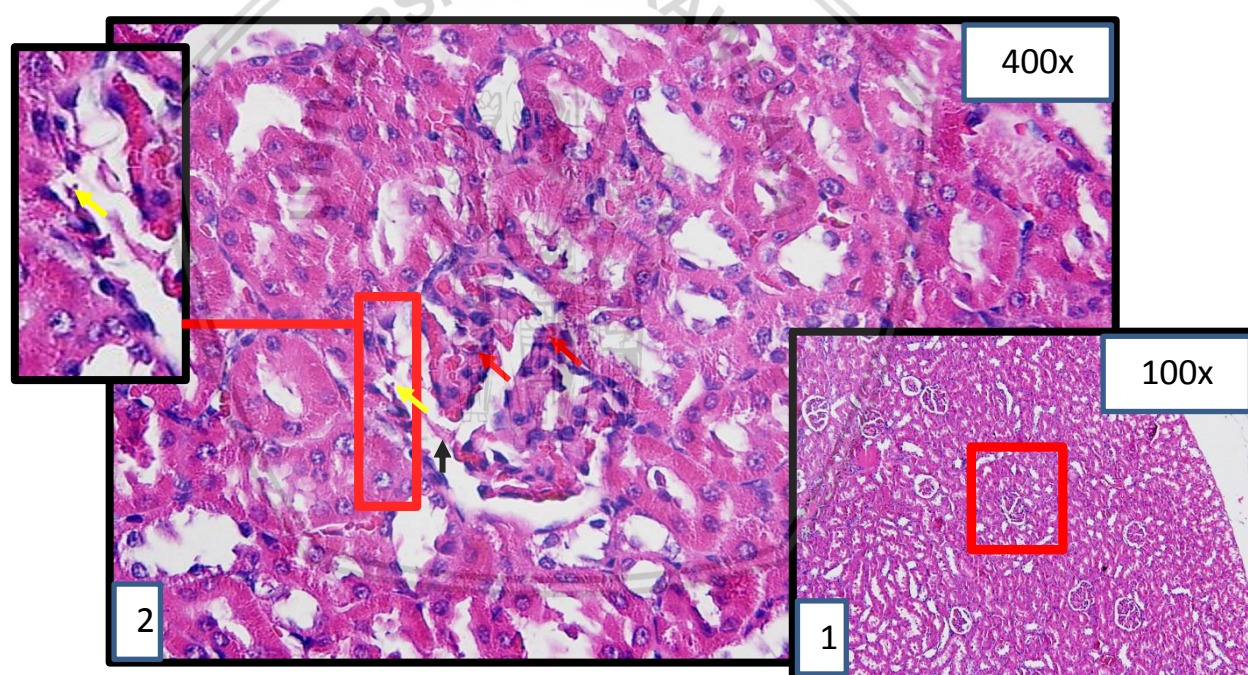
Gambar 5.1.B : Kontrol Positif atau DM (perbesaran 400x). (Panah hitam) Erosi sel epitel tubulus, (Panah kuning) terdapat ekspansi sel mesangial, (Panah biru) Erosi sel epitel kapsula bowman. Terjadi nekrosis dan perubahan inti sel (Piknosis, Kariolisis dan Karioreksis) pada daerah tubulus.

Kerusakan ginjal disebabkan oleh peningkatan ROS akibat induksi *Streptozotocin*. Peningkatan ROS pada kondisi hiperglikemia dapat memicu terjadinya ikatan ROS dengan PUFA pada fosfolipid bilayer dan terjadi peroksidasi lipid sehingga merusak struktur membran sel pada ginjal (Kamble *et al.*, 2015). Oleh karena itu, peroksidasi lipid inilah yang dapat menyebabkan kerusakan struktur sel. Kerusakan struktur sel yang terus terjadi dapat mengakibatkan terlepasnya glomerulus dari kutub vaskuler dan tubuler serta erosi epitel kapsula bowman. Ekspansi sel mesangial merupakan perluasan sebaran sel mesangial pada glomerulus melalui peningkatan produksi ECM (*Extra Celuler Matrix*) glomerulus dan

proliferasi sel mesangial. Pada keadaan normal, sel mesangial terdapat pada bagian juxtaglomerular (Mescher, 2013). Sedangkan, pada kondisi hiperglikemia terjadi perluasan sebaran sel mesangial ke seluruh bagian glomerulus. Peningkatan ROS dan *Advance Glycosylation End Products* (AGEs) dan semakin ditumpuk pada jalur inflamasi di ginjal. Mediator pro-inflamasi menstimulasi sel glomerulus untuk meningkatkan produksi dan mengurangi degradasi dari protein ECM (Qian *et al.*, 2008). Sel mesangial mengeluarkan sitokin proinflamasi dan faktor pertahanan atau imunitas tubuh (Mescher, 2013) dengan tujuan perbaikan jaringan akibat peroksidasi lipid. Pada DM tipe 1, masa perbaikan jaringan tidak berlangsung hingga proses penyembuhan karena kadar ROS yang sangat tinggi dan disertai kerusakan jaringan. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) pada DM tipe 1 dapat menekan kerusakan jaringan, sehingga perbaikan jaringan dapat berlanjut hingga regenerasi sel untuk menggantikan sel yang mati atau rusak.

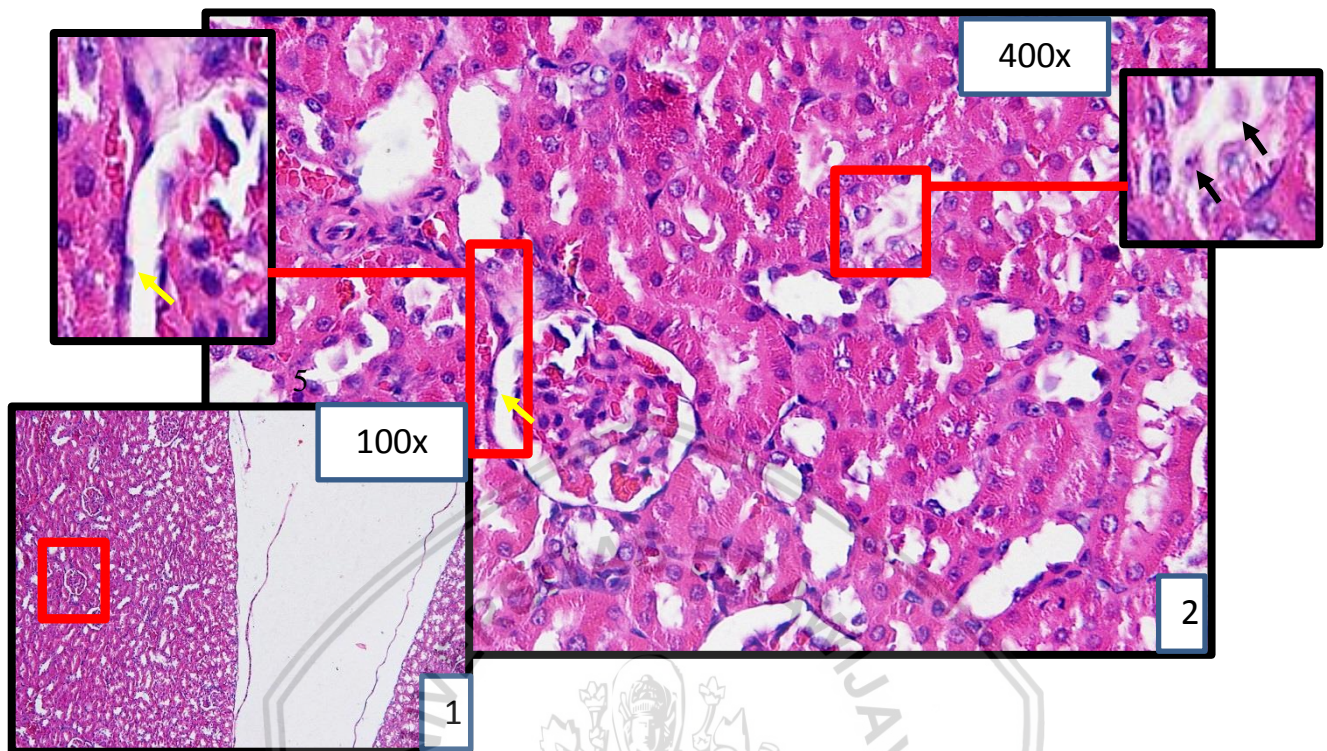
Kerusakan glomerulus menyebabkan berkurangnya kemampuan untuk menyaring darah. Jika kemampuan menyaring darah berkurang, maka sel darah dan protein dapat keluar bersama urin atau tertimbun pada tubulus karena dapat lolos pada proses filtrasi. Kerusakan tubulus menyebabkan terganggunya reabsorpsi dan sekresi. Jika proses reabsorpsi terganggu, maka zat yang masih dibutuhkan tidak dapat diserap kembali oleh tubuh, sehingga keluar melalui urin. Apabila proses sekresi terganggu, maka zat-zat yang tidak dibutuhkan oleh tubuh tidak dapat dikeluarkan melalui urin.

Apabila proses sekresi terganggu, maka zat-zat yang tidak dibutuhkan oleh tubuh tidak dapat dikeluarkan melalui urin sehingga akan bersifat toksik yang dapat merusak organ ginjal (Hasnisa dkk., 2014). Gambaran histopatologi ginjal yang diberi perlakuan terapi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dengan dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB dan 1500 mg/kg BB menunjukkan adanya penghambatan kerusakan terhadap susunan sel epitel jika dibandingkan dengan kontrol positif yang dapat dilihat pada **Gambar 5.1.C, D, dan E**.



Gambar 5.1.C : Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Kelompok P1 perbesaran 400x. (Panah kuning) Erosi sel epitel kapsula bowman, (Panah hitam) struktur glomerulus masih rusak, (Panah merah) terdapat ekspansi sel mesangial.

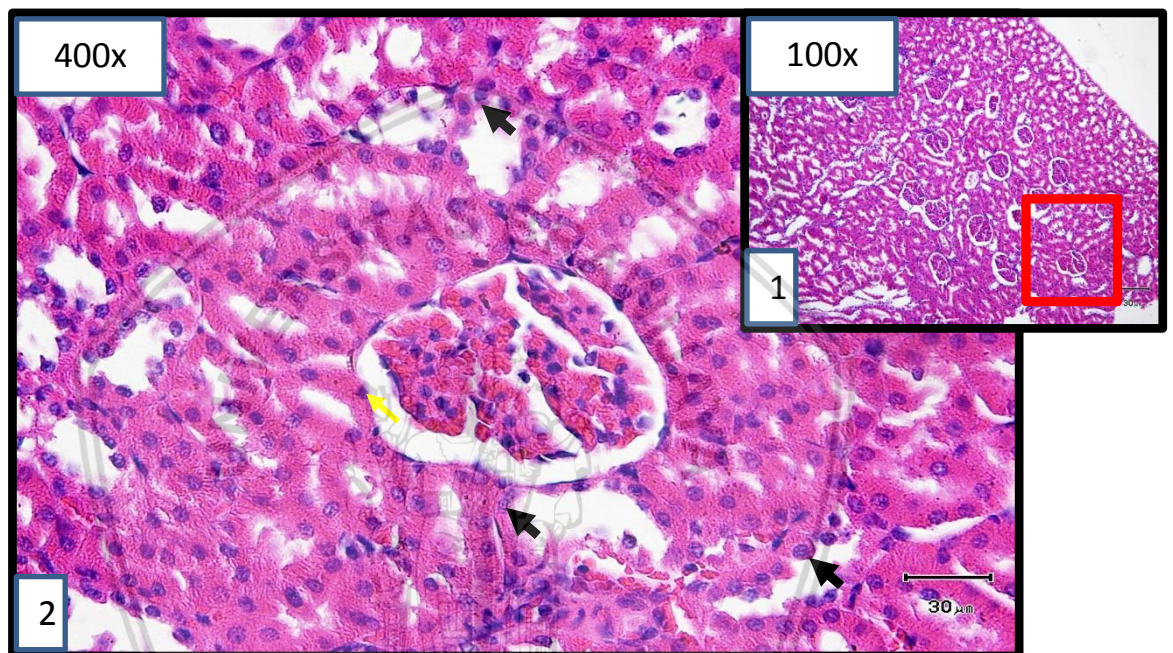
Pada kelompok P1 (**Gambar 5.1.C**), tikus yang diinjeksi STZ dan diberi terapi ekstrak albedo *Citrullus vulgaris* 500 mg/kg BB menunjukkan kerusakan epitel, masih terlihat ekspansi sel mesangial dan kerusakan pada sel tubulus seperti kontrol positif (**Gambar 5.1.B**).



Gambar 5.1.D : Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Kelompok P2 perbesaran 400x. (Panah hitam) Erosi sel epitel tubulus, (Panah kuning) epitel kapsula bowman kembali normal, sel mesangial berkurang dan hampir tidak ditemukan, struktur glomerulus mulai normal.

Histopatologi ginjal kelompok P2 (**Gambar 5.4**) atau kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) DM tipe I yang diterapi dengan ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dosis 1000 mg/kg BB menunjukkan masih terdapat erosi epitel yang terjadi pada kapsula bowman, akumulasi eritrosit sudah sedikit terlihat dibandingkan dengan kelompok P1, struktur glomerulus terlihat normal. Gambaran histopatologi pada kelompok P3 (**Gambar 5.6**) yang diinduksi *Streptozotocin* dan diberi ekstrak dengan dosis 1500 mg/Kg BB) menunjukkan berkurangnya kerusakan pada glomerulus, epitel kapsula bowman terlihat utuh dan kompak dengan bentuk skuamus simpleks dengan inti ditengah, tampak adanya perbaikan susunan

dan bentuk sel glomerulus, ekspansi sel mesangial yang berkurang dan membran filtrasi glomerulus yang lebih tipis dibandingkan dengan kelompok P2. Epitel tubulus tampak normal dengan epitel kuboid simpleks, tampak kompak dengan inti di tengah, serta lumen tubulus dan batas antar tubulus tampak jelas.



Gambar 5.1.E : Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Kelompok P3 perbesaran 400x. (Panah hitam) Sel epitel kuboid tubulus normal, struktur glomerulus terlihat normal, (Panah kuning) Sel epitel kapsula bowman normal.

Kelompok P3 yang diinjeksi STZ dan diberi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dosis 1500 mg/kg BB memiliki kesamaan struktur glomerulus dan tubulus ginjal dengan gambaran kontrol negatif (**Gambar 5.1.A**) tidak ditemukan adanya kerusakan epitel tubulus ginjal yang ditandai dengan batas antar sel yang jelas dan tidak adanya erosi epitel tubulus, selain itu tidak ditemukannya ekspansi sel mesangial, struktur

glomerulus yang menyerupai normal ditandai dengan glomerulus yang masih utuh, tidak ada sel epitel tubulus yang erosi, dibandingkan dengan kontrol positif, dosis pemberian 500 mg/kg BB dan dosis 1000 mg/kg BB. Hal ini menandakan bahwa dosis pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) yang terbaik adalah 1500 mg/kg BB (**Gambar 5.1.E**).

Penurunan kerusakan ginjal pada tiap kelompok perlakuan terapi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) disebabkan oleh aktifitas sitrulin sebagai antioksidan (Sugiyanta, 2011). Pemberian antioksidan terbukti dapat menangkap radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif. Sitrulin memicu peningkatan NO endothelial yang secara langsung berperan dalam membantu sekresi insulin melalui transport membran. Peningkatan sekresi insulin mampu menurunkan kadar glukosa dalam darah, sehingga interaksi antara glukosa dan protein yang akan menghasilkan produk radikal bebas pada ginjal berupa AGEs dapat berkurang. Peningkatan sekresi insulin dapat menurunkan kadar glukosa darah pada kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) terapi yang ditunjukkan dengan hasil rata-rata pengukuran kadar glukosa darah pada kelompok P1, P2, dan P3 yang lebih rendah dibandingkan dengan hasil rata-rata kadar glukosa darah pada kelompok kontrol positif setelah diinduksi *Streptozotocin*. Pengaruh terapi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dalam menurunkan radikal bebas pada organ ginjal tikus putih (*Ratus norvegicus*) model DM tipe I ditunjukkan dengan tidak ditemukan

adanya kerusakan epitel tubulus ginjal yang ditandai dengan batas antar sel yang jelas dan tidak adanya erosi epitel tubulus, selain itu tidak ditemukan ekspansi sel mesangial menunjukkan struktur glomerulus yang menyerupai normal.

Kanwar *et al* (2012) dan Wang *et al* (2011), mengatakan diabetes melitus menyebabkan kerusakan pada sel-sel ginjal yaitu sel glomerular dan sel tubular karena kondisi hiperglikemia. Hiperglikemia menyebabkan peningkatan tiga jalur utama penyebab abnormalitas sel ginjal yaitu aktivasi jalur poliol-sorbitol, glikasi protein dan autooksidasi glukosa. Pada kondisi euglikemia, sebagian kecil glukosa masuk dalam metabolisme alternatif yaitu melalui jalur poliol, melalui jalur ini glukosa diubah menjadi sorbitol, kemudian dengan bantuan enzim sorbitol dehidrogenase sorbitol diubah menjadi *fructose-3-phosphate*. Akumulasi *fructose-3-phosphate* menyebabkan terbentuknya *Advanced Glycation End Products* yang apabila berikatan dengan *Receptor of Advanced Glycation End Products* (RAGE) menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Setiawan dan Suhartono, 2005). *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan radikal bebas yang dapat memecah rantai *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) pada mitokondria dan memicu reaksi peroksidasi lipid yang keduanya berkontribusi dalam gangguan metabolisme sel dan modifikasi DNA yang berujung pada kerusakan histopatologis sel-sel ginjal (Kashihara *et al.*, 2012). Kondisi hiperglikemia menyebabkan terjadinya akumulasi gula pereduksi yang bersifat toksik. Glukosa sebagai gula pereduksi dalam rantai

lurus terdapat gugus aldehid yang memiliki kemampuan dalam melakukan glikasi dengan protein yang memunculkan pembentukan *AGEs*. Adanya *AGEs* yang berikatan dengan *RAGE* memiliki kontribusi dalam pembentukan ROS. *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang dibentuk dari ikatan *AGEs* dan *RAGE* ini memiliki kemampuan untuk menghambat antioksidan protektif tubuh (Kashihara *et al.*, 2012). Autooksidasi glukosa juga meningkat ketika adanya kondisi hiperglikemia yang menyebabkan pembentukan ROS. Akumulasi ROS juga diakibatkan karena adanya aktivasi Protein Kinase C (PKC) (Lee *et al.*, 2003).

Adanya peningkatan radikal bebas dari induksi STZ yang disertai kondisi hiperglikemia akan menyebabkan kerusakan matriks ekstraseluler sehingga epitel terlepas dari membran basalis. Epitel terlepas dari membran basalis akan menyebabkan struktur epitel menjadi renggang, tidak kompak dan mengalami kerusakan (**Gambar 5.1 B, C dan D**). MMP (*Matriks Metalloproteinase*) dan GF (*Growth Factor*) yang terbentuk merupakan hasil produk dari aktivitas fagositosis oleh makrofag. MMP berperan dalam degradasi molekul matriks ekstraseluler dalam jaringan. MMP mempunyai kemampuan untuk memodifikasi integritas jaringan pada kondisi fisiologi normal termasuk dalam perkembangan embrionik, migrasi sel, penyembuhan luka dan resorpsi jaringan. Akan tetapi jika terjadi disregulasi atau aktivasi ekspresi MMP pada kondisi patologis maka akan terjadi remodeling jaringan. *Growth Factor* (GF) adalah suatu polipeptida yang

mengawali pertumbuhan, diferensiasi, dan metabolisme sel, serta mengatur proses perbaikan jaringan (Imbawan dkk., 2013).

Menurut Junqueira *and* Carneiro (2005), terdapat matriks ekstraseluler yang menghubungkan epitel dengan membran basalis. Selain sebagai penghubung antar sel, matriks ekstraseluler yang terdiri dari protein dan kolagen ini juga berfungsi sebagai sumber nutrisi bagi perkembangan epitel. Adanya peningkatan radikal bebas dari induksi STZ yang disertai kondisi hiperglikemia akan menyebabkan kerusakan matriks ekstraseluler sehingga epitel terlepas dari membran basalis. Terlepasnya epitel dari membran basalis akan menyebabkan struktur epitel menjadi renggang, tidak kompak dan mengalami kerusakan (**Gambar 5.1 B, C dan D**).

Hasil pengamatan histopatologi pada kelompok pemberian terapi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) (500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB dan 1500 mg/kg BB) yang diamati pada **Gambar 5.1 C, D dan E** terlihat struktur epitel mengalami perbaikan. Hal ini didukung oleh Wadsworth *et al* (2012), yang menyatakan bahwa pada saat sel epitel terlepas dari membran basalis, plasma dari endotel akan menuju ke tempat terjadinya kerusakan epitel dan menutup membran basalis. Plasma tersebut berfungsi sebagai mediator untuk reseptor yang menginduksi terjadinya perbaikan sel epitel. Membran basalis yang terbuka akibat epitel yang terlepas akan tertutup oleh sel epitel dari sekitar luka. Setelah itu, terjadi proses proliferasi dan diferensiasi untuk mengembalikan struktur dan fungsi epitel sebagai *barrier* aktif. Tahap perbaikan dan remodeling epitel tersebut

distimulasi oleh *growth factor*, dan sitokin memodulasi fungsi protein dan lipid dalam perbaikan epitel. Selain itu, unit nefron ginjal mampu melakukan regenerasi dan perbaikan terhadap sel-sel nya (sel glomerulus dan tubulus) selama tidak terjadi kerusakan seluruhnya melalui *Bone Marrow Derived Cells* (BDMC). *Bone Marrow Derived Cells* (BDMC) berasal dari sumsum tulang yang dapat berdiferensiasi menjadi epitel tubulus, sel mesangial, endothel glomerulus dan podosit (Little, 2006).-

5.3 Pengaruh Pemberian Terapi Ekstrak Albedo Semangka Merah (*Citrullus vulgaris*) Terhadap Ekspresi IL-1 β Ginjal pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe I

Pengaruh pemberian ekstrak sitrulin albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) terhadap ekspresi IL-1 β pada ginjal tikus diamati dengan metode imunohistokimia. Metode imunohistokimia menunjukkan ekspresi IL-1 β pada ginjal dengan warna kecoklatan pada jaringan. Warna kecoklatan timbul akibat ikatan antara antibodi primer, yaitu anti *rat* IL-1 β (H-153:SC-7884) dengan antibodi sekunder *Rabbit anti rat IgG biotin labeled* dan ditambah substrat kromagen *diaminobenzidine* (DAB) yang kemudian berikatan dengan hidrogen peroksida sehingga menghasilkan endapan berwarna coklat. Pewarnaan coklat merupakan hasil penguraian substrat kromagen DAB dan H₂O₂ oleh enzim peroksidase dalam *Strep-Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), maka produksi IL-1 β ditandai dengan adanya warna coklat pada jaringan.

Ekspresi IL-1 β ginjal dengan metode pewarnaan imunohistokimia ditunjukkan dengan warna kecoklatan pada ekstraseluler (interstitial)

sehingga pada preparat imunohistokimia ginjal warna kecoklatan yang terlihat tidak terekspresi pada bagian sitoplasma sel tetapi menyebar diluar sel. Prekursor IL-1 β bersifat tidak aktif, tidak seperti prekursor IL-1 α . Aktivasi prekursor IL-1 β dilakukan oleh kaspase-1, selanjutnya sitokin yang telah aktif dilepaskan di ekstraseluer (Dinarelo, 2011). Ekspresi IL-1 β berkaitan dengan kondisi patologis pada tubuh, sebagai contoh yaitu keberadaan radikal bebas didalam tubuh. Hasil pengamatan pengaruh terapi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) pada tikus putih model DM tipe I terhadap IL-1 β diamati dengan metode pewarnaan imunohistokimia dibawah mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 100X, 400X. Hasil pengamatan imunohistokimia dijelaskan secara deskriptif kuantitatif. Pada analisa kuantitatif untuk melihat presentase area ekspresi IL-1 β pada ginjal digunakan *software Axiovision* (**Lampiran 11**) data kemudian diolah menggunakan analisa *One Way ANOVA* yang dilanjutkan uji *Tukey* yang diambil dari jumlah rata-rata ekspresi IL-1 β .

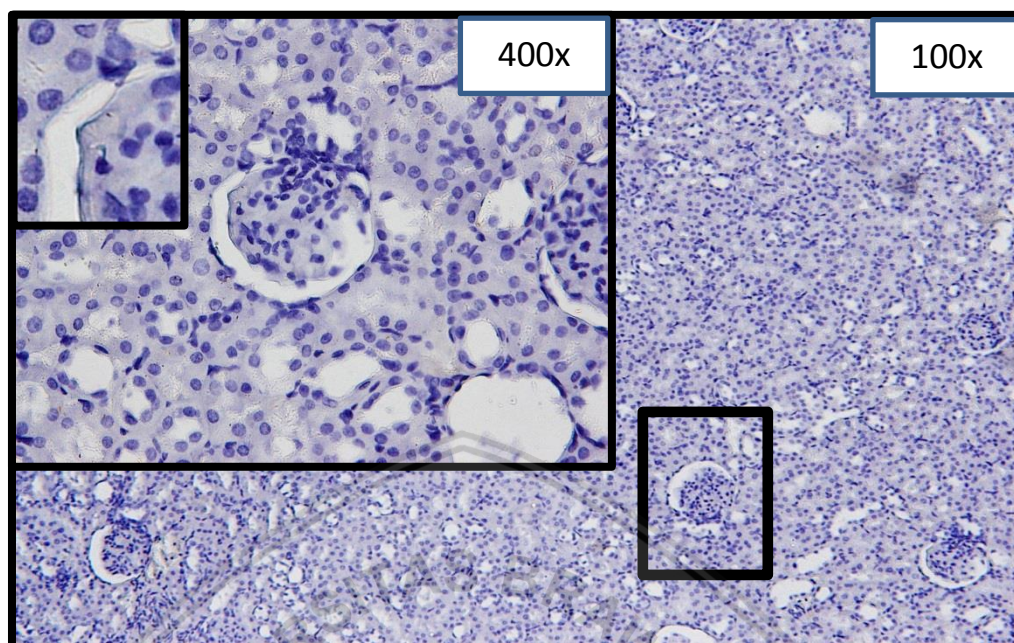
Tabel 5.1 Hasil ekspresi IL-1 β pada masing-masing perlakuan

Perlakuan	Ekspresi IL-1 β (Mean \pm SD)
Kontrol negatif (KN)	0,304 \pm 0,046 ^a
Kontrol positif (KP)	0,652 \pm 0,053 ^c
Dosis 500 mg/Kg BB	0,464 \pm 0,047 ^b
Dosis 1000 mg/Kg BB	0,359 \pm 0,041 ^a
Dosis 1500 mg/Kg BB	0,310 \pm 0,046 ^a

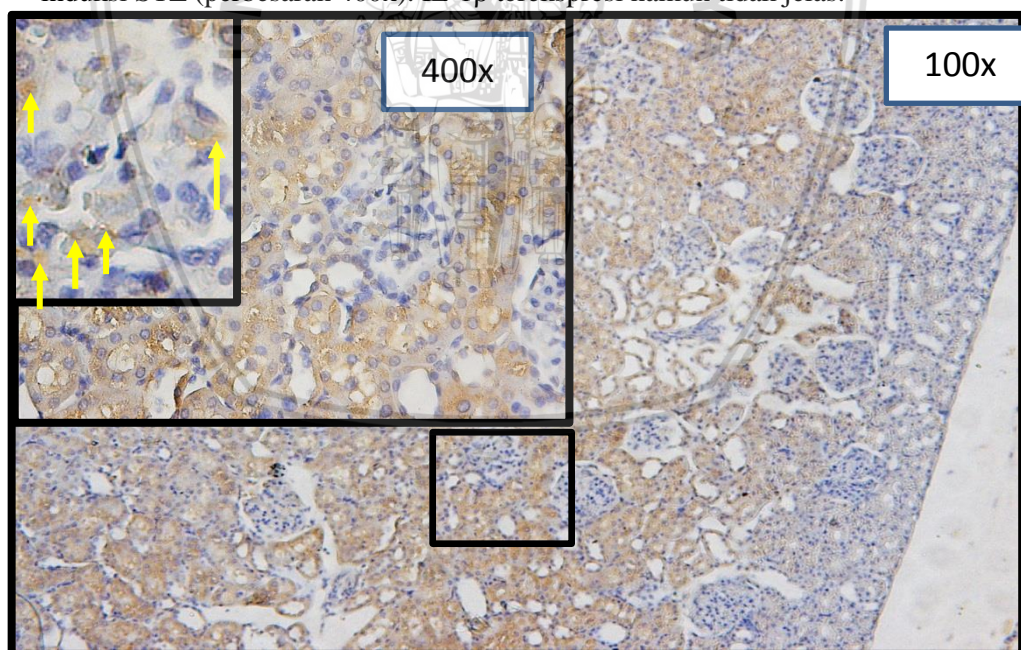
Keterangan : Notasi a,b,c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan.

Hasil perhitungan rata-rata ekspresi IL-1 β pada ginjal tikus putih model diabetes melitus tipe 1 menunjukkan bahwa ekspresi IL-1 β tertinggi ada pada kelompok perlakuan Kontrol Positif (KP) dan ekspresi IL-1 β terendah pada kelompok perlakuan Kontrol Negatif (KN). Melalui hasil uji *Tukey* terdapat perbedaan pada ekspresi IL-1 β , kelompok perlakuan KP dengan kelompok perlakuan dosis 500 mg/Kg BB. Perbedaan nyata terlihat pada kelompok perlakuan KP dengan kelompok perlakuan dosis 1000 mg/Kg BB dan kelompok perlakuan dosis 1500 mg/Kg BB dengan demikian dapat dikatakan tidak ada perbedaan antara kelompok perlakuan dosis 1000 mg/Kg BB dengan kelompok perlakuan dosis 1500 mg/Kg BB. Rata-rata penurunan ekspresi IL-1 β paling besar terjadi pada kelompok perlakuan dosis terapi 1500 mg/Kg BB (P3).

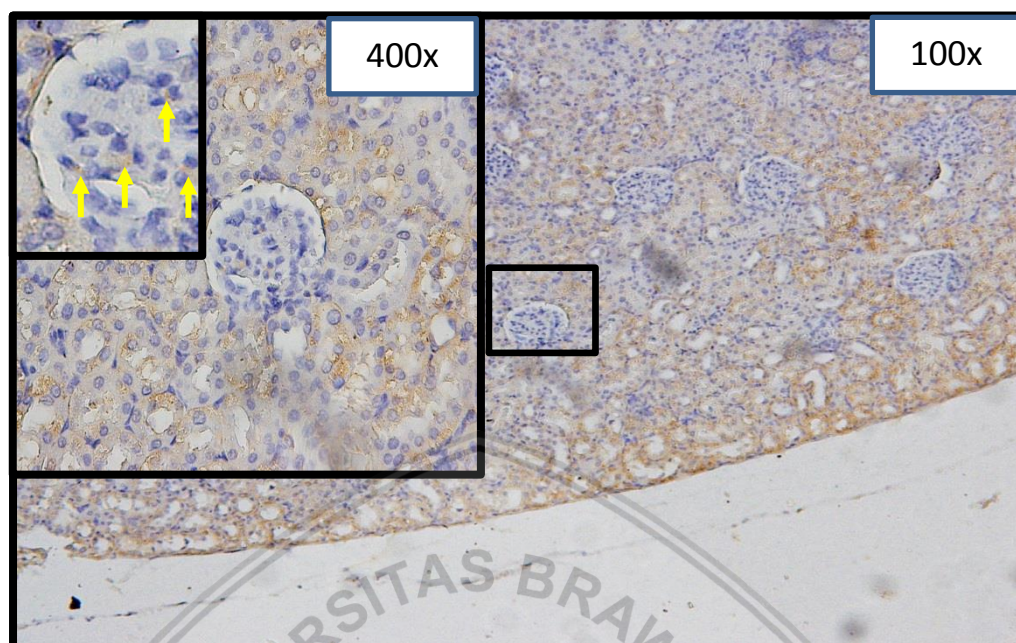
Pada kelompok perlakuan kontrol positif (KP) (**Gambar 5.1 A**) menunjukkan warna coklat yang sangat banyak ($0,652 \pm 0,053$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan kontrol negatif (KN) $0,304 \pm 0,046$ (**Gambar 5.1 B**). Peningkatan ekspresi IL-1 β pada kelompok KP terjadi akibat inflamasi pada jaringan ginjal. Pada keadaan normal yang ditunjukkan pada kelompok KN masih ditemukan ekspresi IL-1 β karena secara normal IL-1 β diproduksi oleh sel atau makrofag sebagai sistem pertahanan non spesifik. Ekspresi IL-1 β ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada tiap kelompok perlakuan disajikan dalam gambar histopatologi ginjal dibawah ini.



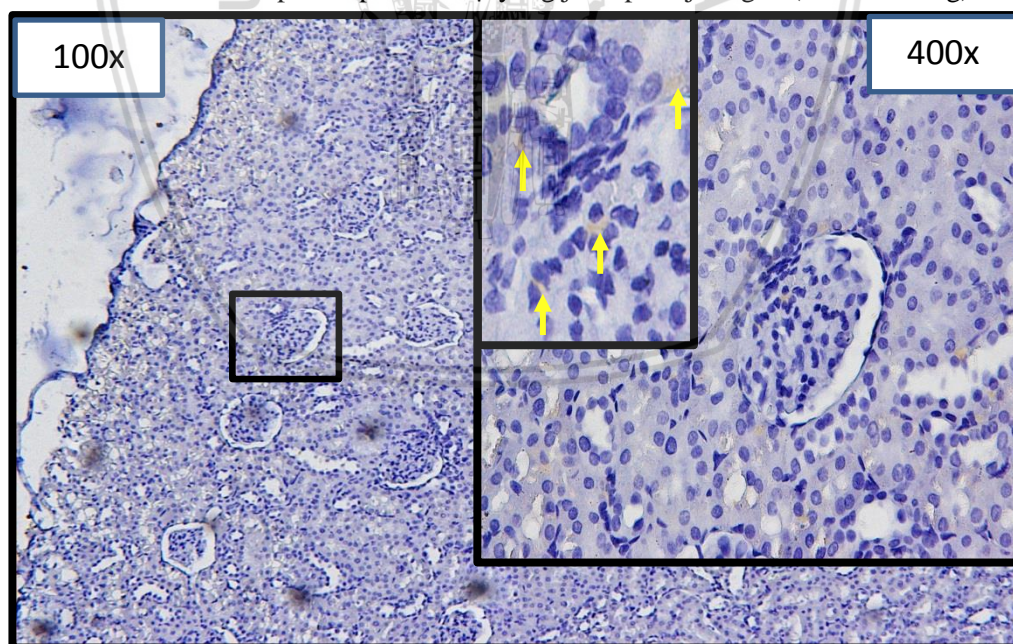
Gambar 5.2 A Hasil imunohistokimia organ ginjal. Kontrol negatif (tikus sehat tanpa pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dan tanpa induksi STZ (perbesaran 400x). IL-1 β terekspresi namun tidak jelas.



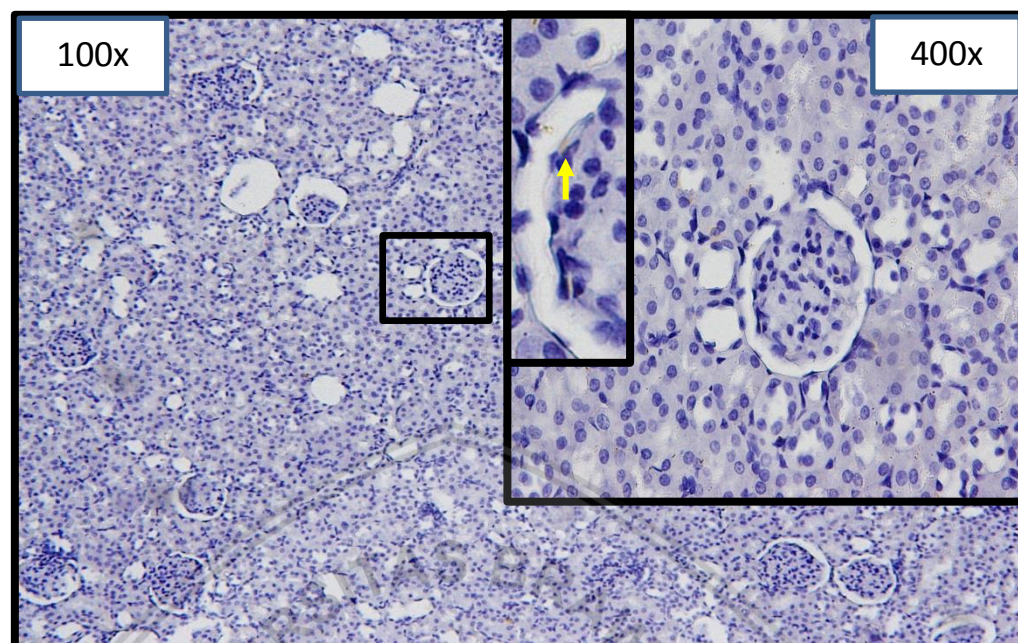
Gambar 5.2 B Hasil imunohistokimia organ ginjal. Kontrol positif (tikus model DM dengan perlakuan induksi STZ, tanpa pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) (perbesaran 400x). Ekspresi IL-1 β merupakan warna kecoklatan pada jaringan yang ditunjukkan anak panah (Panah kuning)



Gambar 5.2 C Hasil imunohistokimia organ ginjal. Kelompok Perlakuan 1 (P1) (tikus model DM dengan perlakuan induksi STZ, dan pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dosis 500 mg/kg BB (perbesaran 400x). Terlihat masih terdapat ekspresi IL-1 β yang jelas pada jaringan (Panah kuning)



Gambar 5.2 D Hasil imunohistokimia organ ginjal. Kelompok Perlakuan 2 (P2) (tikus model DM dengan perlakuan induksi STZ, dan pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dosis 1000 mg/kg BB (perbesaran 400x). Ekspresi IL-1 β sudah mulai berkurang dan hanya sedikit terekspressi (Panah kuning)



Gambar 5.2 E Hasil imunohistokimia organ ginjal. Kelompok Perlakuan 3 (P3) (tikus model DM dengan perlakuan induksi STZ, dan pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dosis 1500 mg/kg BB (perbesaran 400x). Ekspresi IL-1 β sudah berkurang bahkan tidak terlihat dan mendekati gambaran imunohistokimia pada kelompok Kontrol negatif.

Ekspresi IL-1 β pada kontrol negatif dapat ditemukan karena menurut Garlanda *et al* (2013), secara normal IL-1 β diekspresikan pada jaringan ekstraseluler. Peningkatan ekspresi IL-1 β pada kelompok KP disebabkan inflamasi karena adanya radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas terbentuk karena adanya gangguan pada metabolisme tubuh. Menurut Smith (2005), radikal bebas terbentuk sebagai produk dari reaksi nonenzimatik dan enzimatis tubuh, radikal bebas dapat merusak susunan struktur dari membran, protein, dan DNA sel.

Diabetes melitus (DM) tipe I menyebabkan kerusakan sel β pankreas sehingga mengganggu produksi insulin. Defisiensi insulin mengakibatkan kadar glukosa dalam darah meningkat atau hiperglikemia. Keadaan

hiperglikemia meningkatkan stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan radikal bebas atau ROS (Permana, 2015). ROS mengakibatkan PRR (*Pattern Recognition Reseptor*) yaitu NLRP3 makrofag mengenali DAMP (*Danger Associated Molecular Cell Pattern*) yang diaktifkan oleh *protease caspase-1* untuk membentuk IL-1 β (Castejon *et al.*, 2011). Menurut Bratawidjaja (2006), stres oksidatif disebabkan oleh peningkatan senyawa oksigen reaktif atau ROS yang mengaktifkan protein kinase C (PKC). PKC memicu aktivitas NF κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) yang merupakan faktor transkripsi pada mamalia untuk mengontrol sejumlah gen penting contohnya IL-1 β . Ketika NF κ B berpindah dari sitoplasma menuju nukleus, DNA target akan diikat dan makrofag distimulus untuk menghasilkan sitokin proinflamasi seperti IL-1 β . Produksi IL-1 β yang tinggi menandakan inflamasi pada organ hepar. Inflamasi merupakan suatu respon tubuh dalam mengontrol infeksi dan memicu perbaikan jaringan, namun dapat pula memicu kerusakan jaringan sekitar. Sitokin-sitokin inflamasi diproduksi selama proses inflamasi yang sering terdeteksi pada penyakit diabetes melitus (Dandona and Aljada, 2004).

Penurunan ekspresi IL-1 β seperti yang ditunjukkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 pada ginjal disebabkan karena pemberian ekstrak albedo *Citrullus vulgaris* yang mengandung sitrulin. Rata-rata ekspresi IL-1 β pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 lebih sedikit dibandingkan kelompok KP disebabkan karena adanya terapi sitrulin ekstrak albedo *Citrullus vulgaris* yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi, antioksidan berfungsi untuk menetralkan radikal bebas (ROS) di dalam tubuh

sehingga kerusakan sel β pankreas dapat dihambat. Terhambatnya kerusakan sel β pankreas dapat meningkatkan sekresi insulin sehingga keadaan hiperglikemia dapat menurun (Ghorbani, 2014). Kadar glukosa dalam darah yang menurun maka akan menghambat aktivitas protein kinase C (PKC) sehingga PKC tidak dapat mengaktifkan NF- κ B untuk menstimulasi gen pro-inflamasi seperti IL-1 β . Sitrulin sebagai antiinflamasi juga mampu menonaktifkan NF- κ B sebagai faktor transkripsi sel eukariotik, dengan demikian mampu menurunkan sekresi berbagai sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β . Ekspresi IL-1 β yang menurun maka proses inflamasi dan respon seluler termasuk aktivasi gen yang terlibat dalam inflamasi. Ketiga kelompok perlakuan terapi (P1, P2 dan P3) ketiganya menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 β tetapi perbedaan nyata hanya terlihat pada kelompok terapi dosis 1000 mg/Kg BB (P2) dan kelompok terapi dosis 1500 mg/Kg BB (P3) dengan kelompok KP.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Hasil dari penelitian yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dengan dosis terbaik yaitu 1500 mg/Kg BB secara nyata dapat menurunkan ekspresi IL-1 β pada ginjal tikus putih model diabetes mellitus tipe 1.
2. Pemberian ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) dengan dosis pemberian 1500 mg/Kg BB dapat menurunkan kerusakan ginjal.

6.2 Saran

Saran yang dapat diberikan peneliti sehubungan dengan hasil penelitian mengenai efek terapi ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*) terhadap hewan model diabetes mellitus tipe 1 yaitu diperlukan penelitian lanjutan mengenai dosis toksik terhadap ekstrak albedo semangka merah (*Citrullus vulgaris*).



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Liethman, A.H., Pillai, S. 2007. *Cellular And Mollecular Immunology*. International Edition, 6th Edition. Saunders Elsevier, USA. 19-39, 262.
- Alatas, H., Tambunan, T., Trihono, P.P., Pardede, S.O. 2002. *Buku Ajar Nefrologi Anak Edisi 2*. Ikatan Dokter Anak Indonesia. Jakarta.
- American Diabetes Association., 2012. *Diagnosis and Classification of Diabetes Melitus*. Diabetes Care volume 35 Supplement 1 : 64-71.
- Animesh, B. 2006. Prevention of Type 2 Diabetes -Life style modification with diet and physical activity Vs activity alone, Karolinka Institute. Available from <http://ki.se/content/1/c6/04/90/19/AnimeshBiswas.pdf>. [Diakses 11 Desember 2016]
- Anita, D.C. 2014. Kadar Glukosa Darah dan Malondialdehid Ginjal Tikus Diabetes yang Diberi Latihan Fisik. *Muhammadiyah Journal of Nursing*. 109-116.
- Anwer, T. 2014. Melatonin Ameliorates Hyperinsulinemia, Glucose Intolerance and Insulin Resistance in STZ-Nicotinamide Induced Type 2 Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* Vol 6(2)
- Ardinata, S.C. 2015. Analisa Kadar Likopen Pada Semangka Dengan Menggunakan Spektrofotometer. [Tugas Akhir]. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Aulani'am, D.W. Soetmadji, F. Fatchiyah, and B.S. Sumitro. 2005. Detection of GAD 65 auto antibodies of type 1 diabetes using GAD 65-abs reagen produce from bovine brain tissue. *Medical Journal of Indonesia*, 14:197-205.
- Baratawidjaja, K.G dan I, Rengganis. 2013. *Imunologi Dasar Edisi Ke-10*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Press.
- Breyer, J.A. 2000. Diabetic Nephropathy in Insulin Dependent Patients. *American Journal of Kidney Disease*. Vol XX No.6 pp 533-547
- Castejon, L.G., and Brough, D. 2011. *Understanding the Mechanism of IL-1 β Secretion*. Elsevier. Manchester. 189-195.

- Catchpole, B., J.M Ristic, and L.M Fleeman. 2005. Canine Diabetes Mellitus: Can Old Dogs Teach Us New Trick. *Diabetologia*. 48:1948-1956
- Dalimartha, S. 2005. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Diabetes Melitus*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Dandona, P., and Aljada, A. 2004. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology*, 25:4-7
- David, M. 2004. Laboratory Animal Medicine and Science series II. Health Sci. Coni. Edu. USA. Washington University.
- Deshmukh, C.D., A. Jam dan S.T Mukul. 2015. Phytochemical and Pharmacological Profile of *Citrullus lannatus*. *Biolife* 3(2); 483-488.
- Dinarelo dan J. A., Gelfand, Garlanda, C., C.A.,. 2013. The Interleukin-1 Family: Back to the future. NIH Public access, 2-5.
- Dipiro, J.T., Wells, B.G., Talbert, R.L., Yee, G.C., Matzke, G.R., and Posey, L.M. 2005. Pharmacotherapy. 6th Edition. Appleton ang Lange. New York. 1-13.
- Ditjen Bina Farmasi dan Alkes. 2005. Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Diabetes Mellitus. Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Eizirik and T. Maandrup-Poulsen. 2001. A choice of death the signal transduction of immune mediated beta cell apoptosis. *Diabetologia* 44: 2115-2133.
- Endo, J. 2015. Diabetes in Pets is Serious. <http://citizensvoice.com/arts-living/diabetes-in-pets-is-serious-1.1964712>. [diakses 12 Desember 2016.
- Etuk, E.U. 2010. Animals Models for Studying diabetes Melitus. *Agriculture And Biology Journal Of North America*. ISSN Print: 2151-75, ISSN Online: 2151-7525.
- Fischer, A.H., K.A. Jacobson, J. Rose, dan R. Zeller. 2008. Hemoatoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harb Protoc*. DOI:10.1101.
- Fujiwara, N. and Kobayashi, K., 2005, Macrophage in Inflammation, *US National Library of Medicine National Institute of Health*, 4(3): 281-286.
- Garlanda, C., Dinarelo, A.C., and Mantovani. A. 2013. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *J.immuni*. 39(6):1003-1018

- Geneser, F. 2007. *Atlas Berwarna Histologi*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Ghorbani, Z., H. Azita, and M. Parvin. 2014. Anti-Hyperglycemic and Insulin Saensitizer effects of Turmeric and its Principle Constiturmt Curcumin. *International Journal Endocrinol Metabolism*. 1-9
- Gunn-Moore, D. 2013. *Diabetes Mellitus in Cats*. Crieff 2 Day Small Animal CPD Meeting. United Kingdom. 284-304
- Guoyao, W., J.K Collins, V. Perkins, K.D, Dolan, K.A, Kelly, and Meininger, J.C. 2007. *Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine vailability and ameliorates the metabolic syndromein zucker diabetic fatty rats*. American Society For Nutrition.
- Guyton, A.C., and Hall, J.E. 2006. *Textbook of Medicine Physiology*. 11th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders.
- Guyton, A. C. and Hall, J.E; alih bahasa, Irawati; editor Rachman L. Y, ,2011, *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Ed. 11, Jakarta: EGC.
- Hadisaputro, S., R.R.J. Djokomoeljanto, Judiono, M.H.N.E. Soesatyo. 2012. The Effect of Oral Plain Kefir Supplementation on Proinflammatory Cytokine Properties of The Hyperglycemia Wistar Rats Induced by *Streptozotocin*. *Acta Medica Indonesiana – The Indonesian J. Intern med.*, 442(2) : 100-104.
- Hasnisa., U.P Juswono, dan A.Y.P Wardoyo. 2014. *Pengaruh Paparan Asap Kendaraan Bermotor Terhadap Gambaran Histologi Organ Mencit*. FMIPA Universitas Brawijaya. Malang.
- Hau, J. and G.L.Jr.v. Hoosier. 2006. *Handbook of Laboratory Animal Science* 2nd Edition. CRC Press: London.
- Imbawan, E.I.G.N., T.R Putra, dan G. Kambayana. 2013. *Korelasi Kadar Matrix Mettaloproteinase 3 (MMP-3 Dengan Derajat Beratnya Osteoartiritis Lutut*. Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Bali.
- Ishartadiati, K. 2008. *Peranan TNF, IL-1 dan IL-6 Pada Respon Imun Terhadap Protozoa*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma.
- Ismayanti, Bahri, Syaiful dan Nurhaeni. 2012. Kajian Kadar Fenolat dan Aktivitas Antioksidan Jus Kulit Bah Semangka (*Citrullus Lanatus*). *Online Jurnal of Natural Science*. Vol. 2(2): 36-45

- Irsyandi, Y. 2008. *The Effect Of Caterpillar Fungus (Cordyceps sinensis [Berk] Sacc.) Toward interleukin 2 Level In Paracetamol-Induced Mice (Mus musculus L.)*. Pusat Penelitian Ilmu Kedokteran (PPIK). Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha.
- Janvier, L. 2004. *Research Models*. <janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/outbred-rats/product/Old_WISTAR2.html> Diakses tanggal [5Juli 2017].
- Juhriyyah, S. 2008. *Gambaran Histopatologi Organ Hati dan Ginjal Tikus pada Intoksikasi Akut Insektisida (Metofluthrin, D-Phenothrin, D-Allethrin) dengan Dosis Bertingkat*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Jusuf, A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Jakarta . Bagian Histologi FKUI.
- Kamble, P.M., S.C. Choudhari, dan A.S. Yadav. 2015. Study of Lipid Profile, Oxidative Stress, and Antioxidant Satatus in Type 2 Diabetes Mellitus. *WIMJOURNAL*. Vol. 2(1).
- Kanwar, Y.S., Wada, J. Sun, L. Xie, P. Elisabeth. 2012. Diabetic Nephropathy: Mechanisms of renal Disease Progression. *Experimental and Biology Medicine*. Vol 233 : 411
- Kashiharra, N. Y. Haruna, V.K. Kondeti and Y.S Kanwar. 2010. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Curr Medical Chemical*. 2010: 17(34) : 4256-4269
- Kumar, V., R.S. Cotlan dan S.J. Robbins. 2007. *Buku ajar patologi 7nd-ed*. Vol.I. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC: 189-1.
- Kusumadewi, W. 2012. *Perbandingan Kadar Interleukin-1 beta (IL-1B) dalam cairan Krevikular Gingiva Anterior Mandibula Pasien pada Tahap Awal Perawatan Ortodorti Menggunakan Braket Selfi-Ligating Pasif dengan Braket Konvensional Pre-Adjurted MBT [TESIS]*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta : Gajah Mada University Press
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Surabaya. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.

- Lawrence, J.C. 1994. Insulin and Oral Hypoglycemic Agents, In Brody. T.M., Larner, J., Minneman, K.P., and Neu, H.C. (Ed.), *Human Pharmacology*. 2nd Ed.523-539. Mosby. London.
- Lee, H. B., H.Hunjo and G.L. King. 2003. Reactive Oxygen Species and Diabetic Nephropathy. *Journal Am Soc Nephrol* 14: S209-S210, 2003
- Little, M.H. 2006. Regrow or Repair: Potential Regenerative Therapies for the Kidney. *JASN* September 2006 vol 17 no.9 2390-2401
- Liu, Y. 2006. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69: 213–217, 2006
- McClung, K.P., C.A. Roneker, W. Mu, J.D. Lisk, P. Langlais, F. Liu and X.G. Lei.2004. Development of Insulin Resistance and Obesity in Mice Overexpressing Cellular Glutathione Peroxidase. *Proc Natl Acad Scie USA* 101(24) : 8852-8857.
- Mealey, B. L., and W. O. Thomas. 2006. Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *AAP-Commissioned Review Journal Periodontal* august 2006: 77(8)
- Mescher, A.L. 2013. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas 13th Edition. Mc. Graw Hill Education. ISBN: 978-0-07-180720-3
- Mittal, R.D., K.B. Hermant, K.M. Parmeet. 2008. Predisposition Of Genetic Polymorphism With The Risk of Urolithiasis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. Vol 23(2) :106-116.
- Montgomery, D.C., and S. Kowalsky. 2011. *Intrpduction to Statistical Quality Control 5th Ed*. John Wiley & Sons (ASIA) Pte Ltd. Singapura.
- Nelson, D.L. And M.M. Cox. 2004. *Lehninger Principles Biochemistry 4th Edition*. USA: Wincosin Madison Publishing.
- Nugroho, E. Agung. 2006. Review: Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi Dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *BIODIVERSITAS ISSN: 1412-033X*. Volume 7, Nomor 4 Oktober 2006. Halaman: 378-382.
- Nur, S.N., Awaloei, Henock dan Jane Wuisan. 2016. Uji Efek Air Perasan Albedo Semangka Kuning (*Citrus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) terhadap Kadar Glukosa Darah pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Aloksan. *e-Biomedik* 4(1) : 1-7

- Pathak, S., H.C. Dorfmueller, V.S. Borodkin and M.F. Aalten. 2008. Chemical Dissection of the Link Between *Streptozotocin*, O-G1cNac and Pancreatic Cell Death. *Pudmed Central J.* 15(8): 799-807.
- Permana, I.K. 2015. Efek Pemberian Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma longa* L.) terhadap Kadar Glukosa Darah serta Ekspresi Interleukin-1 β pada Pulau Langerhans *Rattus norvegicus* Model Diabetes Mellitus Tipe 1 yang Diinduksi Streptozotocin[Skripsi].Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Pho, K. 2005. Diabetes mellitus. <http://www.nlm.nih.gov/melineplus/ency/article/000305.html>. Diakses tanggal [10/07/2017].
- Pick , 2003. *Cardiovascular Disease and Diabetes. Text Book of Diabetes. Third Edition.* USA. Blackwell Science Ltd.
- Pinto, C.F., M. Watanabe, C.D Fonseca, C.I Ogata, and M.F.F Vattimo. 2012. *The Sepsis as cause of Acute Kidney Injury : An Experimental Model.* University of Sao Paulo of Nursing. Brazil
- Pollock, C. 2010. Rat (*Rattus norvegicus*). Diakses melalui <http://lafeber.com/vet/basic-information-for-rats/> [5 Juli 2017].
- Poretsky, L. 2010. *Principles of Diabetes Mellitus.* New York: Springer Science & Business Media.
- Powers, A.C., 2005. *Diabetes Mellitus.* In: Kasper, Dennis L., Anthony S. Fauci, Dan L. Longo, Eugene Braunwald, Stephen L. Hauser, and J. Larry Jameson. *Harrison's Principles of Internal Medicine Ed 16.* USA: McGraw-Hill Companies, Inc. 2152-2179.
- Pramono, S., 2002, Kontribusi bahan obat alam dalam mengatasi krisis bahan obat di Indonesia, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 1(1), 18-20.
- Price, A. Sylvia. 2006. *Metabolisme Glukosa dan Diabetes Melitus, patofisiologi Ed. 6.* Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Price, A.S., and Wilson, L., Mc. Carty. 2003. *Patofisiologi Konsep Penyakit. Jilid 3.* Alih Bahasa: Peter Anugrah. Editor: Caroline Wijaya. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Pujimulyani, D. 2012. *Teknologi Pengolahan Buah-buahan dan Sayur-sayuran.* Yogyakarta : Graha Ilmu.

- Rahman, B. 2010. Phytochemical Investigation of *Citrullus lanatus* (Watermelon) Rind [Skripsi]. Department of Pharmacy. East West University.
- Ramadhani, D., I. Kurnia, S. Soetopo, D.Tetrian, I. Ramli, Budiningsih, Andrijono, T. Kurjana, M.D.L Tobing. *Analisis Serta Stitiching Citra Imunohistokimia MB-1 Dengan Immunoratio dan Perangkat Lunak Nish Element*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical Aspect of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 42:405-426.
- Reis, J.S., C.A.V. Amaral, C.M.O Volpe, J.S. Fernandes, E.A Borges, C.A Isoni, P.M.F. Dos Anjos & J.A.N. Machado. 2012. Oxidative Stress and Interleukin-6 Secretion During The Progression of Type I Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 56(7):441-448
- Ren K and R. Torres. 2009. *Role of interleukin-1beta during pain and inflammation*. Department of Neural and Pain Sciences, Dental School & Program in Neuroscience, University of Maryland
- Santoso, B. I. 2001. *Fisiologi Manusia : dari Sel ke Sistem*. Jakarta. 663-676. EGC.
- Schier, R. W. 2007. *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*. Philadelphia Lippincot William and Wilkins.
- Setiawan, B., dan Suhartono. 2005. Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 55:2.
- Sharma, P. dan R. Signh. 2014. Effect of Momordica dioica Fruit Extract on Antioxidant Status in Liver, Kidney, Pancreas, and Serum of Diabetic Rats. *Pharmacognosy Research: A Rapid Publication Journal*. Vol. 6:73-79.
- Shita, A.D.P. 2015. Perubahan Level TNF- α dan IL-1 pada Kondisi Diabetes Mellitus. *Prosiding Dentistry Scientific Meeting II*. 1-7
- Sihombing, M., Tuminah, dan Sulistyowati. 2011. Perubahan Nilai Hematologi, Biokimia Darah, Bobot Organ dan Bobot Badan Tikus Putih pada Umur Berbeda. *Jurnal Veteriner Vol.12 No.1:58-64ISSN: 1411-8327*, Jakarta.
- Singh, P., A. Castilo, and D.S.A. majid. 2014. *Decrease in IL-10 and Increase in TNF- α Levels in Renal Tissues During Systemic Inhibition of*

Nitric Oxide in Anesthetized Mice. Tulane University Health Science Center. Louisiana.

Sobir dan Siregar. 2010. *Budi Daya Melon Unggul*. Gramedia. Jakarta.

Sofia, V., Aulanni'am, dan C.Mahdi. 2013. Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat Terhadap Kadar MDA dan gambaran Histologi Jaringan Ginjal Pada Tikus Diabetes Melitus Tipe 1. *Kimia Students Journal* 1 (1): 119-125.

Suckow, M.A., H, Steven., and C.L, Franglin. 2006. *The Laboratory Rat Second Edition*. A volume in American College of Laboratory Animal Medicine. Academic Press.

Sugiyanta. 2011. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Kulit Semangka (Citrullus Vulgaris Schard) Terhadap Kadar Glukosa Tikus Putih (Rattus Norvegicus) yang diinduksi Streptozotocin dalam: diskusi ilmiah rutin Fakultas Kedokteran Universitas Jember 21 Juli 2011*. Fakultas Kedokteran. Universitas Jember.

Susilowati, R. 2006. Diabetes Melitus, Komplikasi dan Pencegahannya. *Journal Saintika*, Vol. 3. No. 1, 62-71.

Syaifuddin. 2011. Anatomi Tubuh Manusia untuk Mahasiswa Keperawatan. Jakarta : Salemba Medika. 286-289.

Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of *Alloxan* and *Streptozotocin* Action in β Cells of the Rat Pancreas. *Physiology Research*. 50(6) : 535-546.

Verdiansah. 2016. Pemeriksaan Fungsi Ginjal. Bandung: RS. Hasan Sadikin. Vol.3, No. 2, pp. 148-149

Vincenz, L., Szegenzdi, E., Jager, R., Holohan, C., Obrien, T., and Samali, S. 2010. *Cytokine Induced Beta cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitu*. National University of Ireland Galway. Ireland 213.

Wadsworth, S.J., Yang, and D.B Dorscheid. 2012. IL-13, Asthma and Glycosylation in Airway Epithelial Repair. *License In Technology Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology Journal Vol.II* : 12-19.

Wang, G.G., H.L. Xiao, L. Wei, Z. Xue, and Z. Cui. 2011. Protective Effects of Luteoin on Diabetic Nephropathy in STZ-Induced Diabetic Rats. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based*

Complementary and Alternative Medicine Volume 2011, Article ID 323171, 7 pages doi:10.1155/2011/323171

WHO. 2006. *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycaemia*. Switzerland: WHO Press.

Widyastuti, S.K. 2000. Monyet Ekor Panjang (*macaca fascicularis*) sebagai model Diabetes Melitus: Pengaruh Hiperglikemia pada Lipid Darah, Serum Oksida Nitrik (No) dan Tingkah Laku Klinis [Tesis]. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.

